

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON NITRAT UND AMMONIUM
AUF DIE PHOTOSYNTHETISCHE CO₂-FIXIERUNG UND DIE
ASSIMILATION VON ¹⁵N-NITRAT UND ¹⁵N-AMMONIUM VON
BELLEROCHEA YUCATANENSIS v. STOSCH (BACILLARIOPHYCEAE)

Inaugural — Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

von
Hans-Jürgen Roßlenbroich
aus Krefeld

Frankfurt am Main 1981

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Biologie der Universität Frankfurt am Main

Dekan:	Prof. Dr. U. Halbach
1. Gutachter:	Prof. Dr. G. Döhler
2. Gutachter:	Prof. Dr. R. Ziegler

Tag der Promotion: 24. Juni 1981

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON NITRAT UND AMMONIUM
AUF DIE PHOTOSYNTHETISCHE CO₂-FIXIERUNG UND DIE
ASSIMILATION VON ¹⁵N-NITRAT UND ¹⁵N-AMMONIUM VON
BELLEROCHEA YUCATANENSIS v. STOSCH (BACILLARIOPHYCEAE)

Inaugural — Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

von
Hans-Jürgen Roßlenbroich
aus Krefeld

Frankfurt am Main 1981



Die vorliegende Arbeit wurde von 1977 bis 1981
im Fachbereich Biologie (Botanik) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor
Dr. Günter Döhler, danke ich herzlich für die
Themenstellung, die Überlassung des Arbeitsplatzes,
seine stete Hilfsbereitschaft und die großzügige
Unterstützung der Arbeit.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn
Dr. G.M. Hentschel, Stuttgart-Hohenheim, für seine
hilfreiche Unterstützung beim Aufbau der ^{15}N -Proben-
chemie und für wertvolle Diskussionen über die
 ^{15}N -Meßtechnik.

Herrn Prof. Dr. H.A. von Stosch, Marburg/Lahn,
möchte ich vielmals für die freundliche Überlassung
von Reinkulturen verschiedener mariner Diatomeen
sowie für wertvolle Hinweise zur Kulturtechnik
danken.

Herrn Prof. Dr. Mengel vom Institut für Pflanzen-
ernährung der Universität Gießen danke ich für die
Möglichkeit der Messung eines Teils der ^{15}N -Proben.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich
für die Bereitstellung der Geräte zur ^{15}N -Analyse.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG	7
1.1.	Fragestellung	13
2.	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1.	Versuchsobjekt	14
2.2.	Kultur und Anzucht	16
2.3.	Durchführung der ^{14}C -Fixierungs- experimente	20
2.3.1.	Bestimmung der Gesamtfixierungsraten	21
2.3.2.	Durchführung der Kurzzeit-Fixierungen	23
2.3.3.	Extraktion der Photosynthese-Produkte	24
2.3.4.	Ermittlung der Exkretion	26
2.3.5.	Auftrennung der Extrakte	27
2.3.6.	Identifizierung der markierten Substanzen	30
2.3.7.	Bestimmung der Radioaktivität	31
2.4.	Durchführung der Enzym-Tests	35
2.4.1.	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase	35
2.4.2.	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase	36
2.4.3.	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	37
2.5.	Durchführung der ^{15}N -Fixierungs- experimente	37
2.5.1.	Grundlagen der ^{15}N -Meßtechnik	37
2.5.2.	^{15}N -Probenchemie	42
2.5.3.	Inkubation der Diatomeen mit ^{15}N -Nitrat bzw. ^{15}N -Ammonium	51
2.5.4.	Auftrennung der Aminosäuren	52

	Seite
2.5.5. Identifizierung der Aminosäuren	53
2.5.6. Vorbereitung der Aminosäure-Proben für die ^{15}N -Messung	54
2.6. Bestimmung der pool-Größen der freien Aminosäuren	57
2.7. Bestimmung der Bezugsgrößen	61
2.7.1. Pigmentbestimmung	61
2.7.2. Ermittlung der Zellzahl	62
2.7.3. Protein-Bestimmung	62
3. ERGEBNISSE	64
3.1. Einfluß der Stickstoffquelle auf das Wachstum der Diatomeen	64
3.2. Ammonium-induzierte Änderungen im Pigmentgehalt der Algen	66
3.3. Einfluß der Stickstoffquelle auf den Proteingehalt	68
3.4. Einfluß der Stickstoffquelle auf die pool-Größen der freien Aminosäuren	68
3.5. Einfluß der Stickstoffquelle auf die photosynthetische CO_2 -Fixierung	70
3.5.1. Einfluß der Stickstoffquelle auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Gesamtfixierungsraten der mit Ammonium bzw. Nitrat angezogenen Diatomeen	70
3.5.2. Vergleich des ^{14}C -Fixierungsmusters der mit Ammonium bzw. Nitrat angezogenen Diatomeen	71
3.5.3. Einfluß der Nitratkonzentration auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Gesamtfixierungsrate der mit Nitrat angezogenen Diatomeen	77
3.5.4. Einfluß der Ammoniumkonzentration auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Gesamtfixierungsrate der mit Nitrat angezogenen Diatomeen	79

	Seite
3.5.5. Kurzzeitige Ammonium-induzierte Änderungen des ^{14}C -Fixierungsmu- sters der mit Nitrat angezogenen Diatomeen	81
3.5.6. Einfluß der Ammoniumkonzentration auf die ^{14}C -Gesamtfixierungsrate der mit Ammonium angezogenen Diatomeen	85
3.5.7. Einfluß der Stickstoffquelle auf die Aktivität der CO_2 -fixierenden Enzyme (RubP-Carboxylase, PEP-Carboxykinase)	86
3.6. Exkretion ^{14}C -markierter Photosynthese- produkte	88
3.7. Untersuchungen zur Stickstoff- Assimilation	90
3.7.1. Parallel-Fixierung von ^{14}C -Bikarbonat und ^{15}N -Ammonium	90
3.7.2. Einfluß der Stickstoffquelle auf den ^{14}C -Einbau in die Aminosäuren der mit Ammonium angezogenen Diatomeen	93
3.7.3. ^{15}N -Ammonium- bzw. ^{15}N -Nitrat-Assimi- lation von Stickstoff-Mangelkulturen	94
4. DISKUSSION	98
4.1. Photosynthetische CO_2 -Fixierung der marinen planktischen Diatomee <i>Bellerochea yucatanensis</i>	98
4.2. Einfluß der Stickstoffquelle auf die photosynthetische CO_2 -Fixierung	107
4.3. Exkretion von Photosyntheseprodukten	113
4.4. Untersuchungen zur Stickstoff- Assimilation	114
5. ZUSAMMENFASSUNG	121
6. LITERATURVERZEICHNIS	123
7. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	137



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550820_0044

1. E I N L E I T U N G

Die gesamte pflanzliche Netto-Primärproduktion wird auf ca. $1,4 \times 10^{14}$ kg Trockengewicht pro Jahr geschätzt, wovon 40 % durch marines Phytoplankton produziert werden (GOLLEY, 1972). Dies bedeutet, daß pro Jahr 2×10^{13} kg Kohlenstoff durch die Photosynthese des marinen Phytoplanktons in organische Bindung überführt werden (STRICKLAND, 1972). Die von STEEMANN NIELSEN (1952) angegebenen Werte liegen in der gleichen Größenordnung: $1,5 \times 10^{13}$ kg Kohlenstoff/Jahr.

Auf Grund der dominierenden Rolle der Diatomeen im Phytoplankton kann man annehmen, daß dieser Algenklasse ein Anteil von 20 - 25 % an der gesamten Netto-Primärproduktion der Erde zukommt (WERNER, 1977 a). Diese Zahlen deuten auf die überaus wichtige Rolle der Diatomeen als Primärproduzenten hin.

Trotz der großen ökologischen Bedeutung dieser Algenklasse - besonders in marinen Ökosystemen - liegen relativ wenige stoffwechselphysiologische Untersuchungen an marinen Diatomeen vor. Dies ist wohl auf die schwierige Massenkultur gerade der marinen planktischen Arten zurückzuführen. Eine bakterienfreie, kontinuierliche Massenkultur der Algen unter definierten Bedingungen ist aber für stoffwechselphysiologische Untersuchungen eine unabdingbare Voraussetzung. Während der Silikat-Stoffwechsel bei Diatomeen bisher relativ gut untersucht wurde (s. z.B. WERNER, 1977 b), liegen nur wenige Untersuchungen über den photosynthetischen CO_2 -Fixierungsweg mit Hilfe von ^{14}C -Kurzzeitfixierungen an Reinkulturen von marinen Diatomeen vor (GLOVER et al., 1975; HOLDSWORTH und COLBECK, 1976; MUKERJI und MORRIS, 1976; BEARDALL et al., 1976; KREMER und BERKS, 1978). Auch beschränkten sich die bisher durchgeführten Untersuchungen

auf die folgenden Arten: *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum* und *Cyclotella meneghiniana*.

Nach Inkubation der Diatomeen mit radioaktiv markiertem Kohlenstoff im Licht war schon nach kurzen Photosynthesazeiten ein relativ hoher prozentualer Anteil des fixierten Kohlenstoffs in Aminosäuren nachzuweisen. Dies wurde von BEARDALL et al. (1976) auf das Ablaufen einer Art "C₄-Weg" in marinen Diatomeen zurückgeführt. Als PEP-carboxylierendes Enzym wurde von diesen Autoren die PEP-Carboxylase (E.C. 4.1.1.31) nachgewiesen (s. Tab. 1).

Im Gegensatz dazu wurde von HOLDSWORTH und BRUCK (1977) und KREMER und BERKS (1978) jedoch nur eine PEP-Carboxykinase-Aktivität (E.C. 4.1.1.49) in marinen Diatomeen gefunden. Da KREMER und BERKS auch in einer Süßwasser-Diatomee (*Nitzschia palea*) die PEP-Carboxykinase als das β -carboxylierende Enzym fanden, behaupten diese Autoren, daß die PEP-Carboxylase den Diatomeen generell fehlt.

In Tab. 1 sind die bisher vorliegenden Enzymbestimmungen an Reinkulturen von marinen Diatomeen aufgeführt. Auffällig sind besonders die widersprüchlichen Ergebnisse an *Phaeodactylum tricornutum*.

Es ist seit langem bekannt, daß ein Teil des fixierten Kohlenstoffs von den Algen wieder an das Nährmedium abgegeben wird (vgl. z.B. HELLEBUST, 1965; NALEWAJKO, 1966; WATT, 1966). Als Exkretionsprodukte traten vor allem Glykolat, Aminosäuren und Polysaccharide auf. Über die Größe der Exkretion liegen allerdings solch unterschiedliche Daten vor (0 - 75 % der Gesamtfixierungsrate; nach SHARP, 1977), daß bei hohen Exkretionsraten Unzulänglichkeiten bei der Versuchsdurchführung vermutet werden müssen, bzw. daß die von SHARP gestellte Frage: "do healthy cells do it?" berechtigt erscheint. Eine

Tab. 1: Vergleich der in der Literatur angegebenen Aktivitäten der PEP-Carboxylase bzw. PEP-Carboxykinase bei marinen Diatomeen

Objekt	PEP-Carboxykinase	PEP-Carboxylase	Zitat
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i> Bohlin	-	0,2 - 0,8 ¹⁾	MUKERJI und MORRIS (1976)
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i> <i>Skeletonema costatum</i> (Grev.) Cleve Phytoplanktonpopulationen Boothbay Harbor, Maine	- - -	0,53; 0,72 ²⁾ 0,02; 0,06 ²⁾ 0,08 - 0,18 ³⁾	BEARDALL et al. (1976)
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i> <i>Cylindrotheca closterium</i> var. <i>californica</i> <i>Thalassiosira pseudonana</i> clone 3 (Woods Hole Ocean. Inst.)	133 ⁴⁾ 106 ⁴⁾ 44 ⁴⁾	- - -	HOLDSWORTH und BRUCK (1977)
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kütz. <i>Phaeodactylum tricornerutum</i> Bohl. <i>Amphipleura rutilans</i> (Tr.) Cleve	+ 5) + 5) + 5)	- - -	KREMER und BERKS (1978)
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i> Bohlin <i>Coscinodiscus</i> spec. <i>Thalassiosira pseudonana</i> 13-1 (Woods Hole Ocean. Inst.) <i>Thalassiosira pseudonana</i> 3 H (Woods Hole Ocean. Inst.) Phytoplanktonpopulationen Boothbay Harbor, Gulf of Maine	- - - - -	3,86) 96006) 1,06) 1,46) + 5)	GLOVER und MORRIS (1979)

Fortsetzung Tab. 1:

Objekt	PEP- Carboxykinase	PEP- Carboxylase	Zitat
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	8,07)	-	APPLEBY et al. (1980)
<i>Cylindrotheca closterium</i> var. <i>californica</i> (Meres.) Reim. und Lewin	6,47)	-	
<i>Thalassiosira pseudonana</i> Hasle und Heimdahl	2,67)	-	
<i>Chaetoceros calcitrans</i> (Paulsen) Takano	-	3,07)	

- 1) $\mu\text{mol HCO}_3^- / \text{h} \cdot 10^9$ Zellen
- 2) $\mu\text{mol HCO}_3^- / \text{h} \cdot 10^7$ Zellen
- 3) $\mu\text{mol HCO}_3^- / \text{h} \cdot \mu\text{g Chl.a}$
- 4) $\text{nmol HCO}_3^- / \text{min} \cdot \text{mg Chl.a}$
- 5) Enzymaktivitäten wurden nicht angegeben
- 6) $\mu\text{g C/h} \cdot 10^8$ Zellen
- 7) $\mu\text{mol HCO}_3^- / \text{h} \cdot \text{mg Chl.a}$

Substanzidentifizierung von kurzzeitig ausgeschiedenen Photosyntheseprodukten wurde bei marinen Diatomeen - soweit bekannt - bisher noch nicht durchgeführt.

Die Primärproduktion des marinen Phytoplanktons wird in starkem Maße von der Verfügbarkeit anorganischen Stickstoffs und Phosphors im Meerwasser begrenzt. Besonders die Menge an anorganischem Stickstoff kann als limitierender Faktor angesehen werden (RYTHER und DUNSTAN, 1971).

Stickstoff liegt im Meerwasser als molekularer Stickstoff und in Ionenform als Nitrat, Nitrit und Ammonium vor. Die Konzentration des Nitrats wird mit 0,01 - 50 μM , die des Nitrits mit 0,01 - 5 μM und die des Ammoniums mit 0,1 - 5 μM angegeben (SERRA et al., 1978).

Der als Nitrat von der Diatomeenzelle aufgenommene Stickstoff muß vor der Assimilation erst in seine reduzierte Form überführt werden. Diese Reduktion wird durch die Enzyme Nitrat- und Nitrit-Reduktase katalysiert. Hierzu werden 8 Elektronen pro Molekül Nitrat benötigt: 2 Elektronen zur Reduktion des Nitrats zu Nitrit, 6 Elektronen zur Reduktion des Nitrits zu Ammonium (vgl. z.B. HEWITT, 1975). Während die Nitrat-Reduktase (NADH: Nitrat-Oxidoreduktase, E.C. 1.6.6.1) im Cytoplasma der Zellen vorzuliegen scheint und spezifisch für NADH ist, wird für die Nitrit-Reduktase (Ferredoxin: Nitrit-Oxidoreduktase, E.C. 1.7.7.1) der Chloroplast als Wirkungsort angenommen (s. z.B. VENNESLAND und GUERRERO, 1979).

Innerhalb des Chloroplasten kommt es also zwischen der Dunkelreaktion der Photosynthese und der Nitrit-Reduktion zu Ammonium zu einer Konkurrenz um Reduktionsäquivalente. Dies zeigt auch, daß der Chloroplast nicht nur als Ort der photosynthetischen CO_2 -Fixierung anzusehen ist.

Nach Reduktion des Nitrats zu Ammonium werden zwei Möglichkeiten zur Überführung des reduzierten Stickstoffs in organische Bindung diskutiert:

- a) durch das Enzym Glutamin-Synthetase (GS, E.C 6.3.1.2) und
- b) durch das Enzym Glutamat-Dehydrogenase (GDH, E.C. 1.4.1.3).

Durch die Glutamin-Synthetase wird die folgende Reaktion katalysiert:



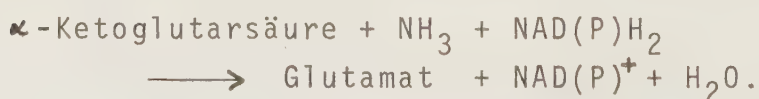
Hierbei wird der Stickstoff unter ATP-Verbrauch auf Glutamat übertragen und erscheint in der Amidposition von Glutamin, das als das primäre Fixierungsprodukt anzusehen ist.

Der Amid-Stickstoff des Glutamins kann dann durch das Enzym Glutamin: α -Ketoglutar säure-Aminotransferase (GOGAT, mit NAD(P)H_2 als Reduktionsäquivalent: E.C. 2.6.1.53; mit reduziertem Ferredoxin: E.C. 1.4.7.1) auf α -Ketoglutar säure übertragen werden:



Es entstehen 2 Moleküle Glutamat, die einerseits wieder als Akzeptor für NH_4^+ , andererseits als Aminogruppendonatoren bei Transaminierungsreaktionen Verwendung finden.

Durch die Glutamat-Dehydrogenase wird der reduzierte Stickstoff direkt auf α -Ketoglutar säure übertragen, und es entsteht Glutamat als primäres Fixierungsprodukt:



Liegen Nitrat und Ammonium, also reduzierter und oxidierter Stickstoff, parallel vor, wie es normalerweise im Meerwasser der Fall sein dürfte, wird von den Diatomeen bevorzugt das

Ammonium aufgenommen (EPPLEY et al., 1969; BROCKMANN et al., 1977). Bei den Untersuchungen von EPPLEY et al. in der Santa Monica Bucht (1979) stellte sich heraus, daß ca. 35 % des durch das Phytoplankton assimilierten Stickstoffs in Form von Ammonium aufgenommen worden war. Die Exkretion von NH_4^+ durch das Zooplankton kann u. U. eine ökologische Bedeutung haben (ANTIA et al., 1975). So beschrieben GOERING et al. (1970) eine durch das Zooplankton verursachte unterschiedliche Verteilung des NO_3^- bzw. NH_4^+ -Stickstoffs in den Wasserschichten.

1.1. FRAGESTELLUNG

In Ergänzung zu den oben beschriebenen Untersuchungen zur photosynthetischen CO_2 -Fixierung bei marinen planktischen Diatomeen sollte der photosynthetische CO_2 -Fixierungsweg bei der marinen tropischen Diatomee *Bellerophoea yucatanensis* v. STOSCH untersucht werden. Zusätzlich sollte das für die PEP-Carboxylierung verantwortliche Enzym charakterisiert werden.

Bei den ^{14}C -Fixierungsexperimenten sollte parallel Art und Größe einer eventuellen Exkretion von Photosyntheseprodukten ermittelt werden.

Wie schon dargelegt wurde, hat der anorganische Stickstoff einen entscheidenden Einfluß auf die Primärproduktion des marinen Phytoplanktons. Neben Nitrat hat Ammonium als Stickstoffquelle für die Diatomeen eine große ökologische Bedeutung. Deshalb erschien es sinnvoll, den Einfluß von Ammonium auf die photosynthetische CO_2 -Fixierung dieser Algen zu untersuchen. Mit Hilfe von ^{15}N -markierten Stickstoffquellen (Nitrat, Ammonium) sollte außerdem der Weg der N-Assimilation bei *Bellerophoea yucatanensis* verfolgt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. VERSUCHSOBJEKT

Als Versuchsobjekt diente die marine planktische Diatomee *Bellerochea yucatanensis* v. STOSCH, die von WERNER 1973 aus küstennahen Gewässern des Golfs von Mexiko bei Porto Progreso, Halbinsel Yucatan, isoliert wurde. Diese zu den Centrales gehörende Diatomee wurde zuerst als *Bellerochea malleus* f. *biangulata* von WERNER und STANGIER (1976) beschrieben und nach einer umfassenden taxonomischen Überprüfung von v. STOSCH (1977) als eine neue Species der Gattung *Bellerochea* erkannt.

Außer an dem oben angegebenen Fundort in Mexiko wurde *Bellerochea yucatanensis* v. STOSCH auch in Australien entdeckt (CROSBY und WOOD, 1958). *Bellerochea malleus* (BRIGHTWELL) HEURCK tritt nach v. STOSCH (1956) im Wattenmeerplankton der Nordsee auf.

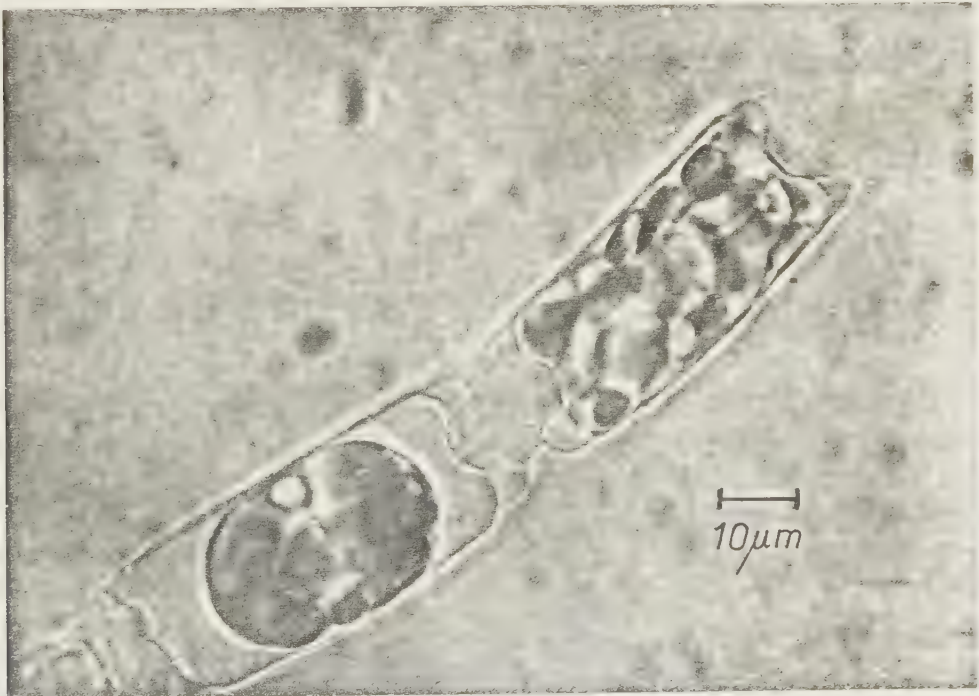


Abb. 1 : Mikrofotographie von *Bellerochea yucatanensis* v. STOSCH. (Die untere Zelle zeigt Reizplasmolyse)

Die aufgeführten Fundorte zeigen die weltweite Verbreitung dieser Diatomeengattung.

Obwohl *Bellerochea yucatanensis* ein planktischer Organismus ist, besitzt diese keine Schwebefortsätze, und die Zellen sind nur sehr schwach verkieselt (v. STOSCH, 1977).

Die Zellen der mehr oder weniger geraden Zellketten lassen sich ohne sichtbare Schädigung leicht voneinander trennen. Bei Durchströmung der Kultur traten so neben einer großen Zahl von Einzelzellen nur ganz kurze Zellketten auf.

Jede Diatomeenzelle besitzt zahlreiche elliptische, durch Fucoxanthin bräunlich gefärbte Chromatophoren mit einem einzigen zentralen Pyrenoid, v. STOSCH (1977).

Die Diatomee *Bellerochea yucatanensis* v. STOSCH wurde als Objekt ausgewählt, weil diese Alge als Modellobjekt eines marinen Phytoplankters für physiologische Untersuchungen besonders geeignet ist. Folgende Gründe sprechen dafür:

- a) die Gattung *Bellerochea* ist ausschließlich marin
- b) eine bakterienfreie Massenkultur der Alge ist relativ problemlos
- c) die Algenzellen besitzen keine Schwebefortsätze, wie das z. B. bei der Gattung *Chaetoceros* der Fall ist, die bei Anreicherungsverfahren abbrechen und somit eventuelle Zellschäden verursachen könnten, da diese Fortsätze hohl und von Plasma ausgefüllt sind (v. STOSCH, persönliche Mitteilung).

2.2. KULTUR UND ANZUCHT

Seit den ersten Kulturversuchen von Süßwasser-Diatomeen (MIQUEL, 1892 a; 1892 b) und marinen Diatomeen (ALLEN und NELSON, 1910) ist die Kulturtechnik für marines Phytoplankton von zahlreichen Autoren ausführlich abgehandelt worden. Hier sei nur auf die zusammenfassenden Darstellungen von EPPLEY (1977) und NEUVILLE und DASTE (1979 a) hingewiesen.

Die Verwendung von natürlichem Meerwasser - angereichert mit Nährstoffen und Spurenelementen - kommt der ökologischen Wirklichkeit zweifellos am nächsten. Allerdings wiesen z. B. ALEEM (1970), JOHNSTON (1963) und SMAYDA (1974) auf die unterschiedliche chemische Zusammensetzung hin, was natürliches Meerwasser als Grundlage von Nährmedien für physiologische Untersuchungen ungeeignet erscheinen läßt.

Bei allen vollsynthetischen Nährmedien - z. B. nach CHAPMAN und RAE (1969), DROOP (1962), LEWIN (1966), PROVASOLI et al. (1957) und WERNER (1966) - ist allerdings eine beachtliche pH-Pufferung durch TRIS, TRICINE oder Glycylglycin erforderlich, um die guten Puffereigenschaften des natürlichen Meerwassers zu simulieren.

KAIN und FOGG (1958) und MCLACHLAN (1964) wiesen darauf hin, daß diese Puffersubstanzen unter Umständen einen Einfluß auf die Wachstumsrate haben können. Bei den eigenen Untersuchungen konnte jedoch kein Einfluß des verwendeten Puffersystems (TRIS-HCl; 0,02 M; pH 8,0) auf den Stoffwechsel der Diatomeen festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein synthetisches Meerwasser verwendet, das "in der ionalen Zusammensetzung ungefähr einem Meerwasser von 35 ‰ Salinität entspricht" (SCHAFER, 1964).

Das Nährmedium wurde in Anlehnung an v. STOSCH und DREBES (1964) und v. STOSCH et al. (1973) hergestellt.

Folgende Substanzen sind in einem Liter H₂O enthalten:

27,83	g	NaCl
1,565	g	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
6,595	g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
0,764	g	KCl
5,671	g	MgCl ₂ · 6 H ₂ O
0,200	g	NaHCO ₃
101,2	mg	KBr
27,68	mg	H ₃ BO ₃

Ein Liter synthetisches Meerwasser enthält:

1	mmol	NaNO ₃ , bzw. NH ₄ Cl
60	μmol	Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O
1	μmol	FeSO ₄ · 7 H ₂ O
0,1	μmol	MnCl ₂ · 4 H ₂ O
10	μmol	Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O
400	μmol	SiO ₂ (als SiO ₂ -Sol, s.u.)
0,0005	μmol	Cobalamin (Vitamin B ₁₂)
0,025	μmol	Aneurin HCl (Vitamin B ₁)
0,025	μmol	Biotin (Vitamin H)

(Alle Lösungen wurden mit autoklaviertem, bidestilliertem Wasser angesetzt.)

Das Nährmedium wurde mit 0,02 M TRIS-HCl-Puffer auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.

Silizium wurde in Form von 0,6 %igem SiO₂-Sol dem Nährmedium zugesetzt. Die Herstellung des SiO₂-Sols erfolgte auf folgende Weise: 100 ml DOWEX-Austauscherharz 50 x 4

(200 - 400 mesh) wurden 5 - 8 mal mit 80° C warmer 5 n HCl in einem Becherglas unter kräftigem Umrühren aufgeschlämmt, das Harz absitzen gelassen und der Überstand abdekantiert. Darauf wurde in der gleichen Weise mit H₂O bis etwa zur Säurefreiheit gespült. Ca. 80 ml des so behandelten Harzes wurden dann in eine Säule eingefüllt und weiter mit H₂O bis pH 5 eingewaschen. Auf diese Säule wurde dann eine Na-Silikat-Lösung (9 g Na₂SiO₃ · 9 H₂O in 300 ml H₂O 24 Std. unter Rühren gelöst, dann abfiltriert) unter leicht erhöhtem Druck aufgegeben und mit H₂O nachgewaschen. Das Eluat mit einem pH-Wert kleiner als 4,0 wurde aufgefangen und - falls erforderlich - mit einigen Tropfen 3 n HCl auf einen pH-Wert von 3,2 gebracht. 5 ml dieser Lösung wurden dann eingetrocknet, gegläht und der Rückstand gewogen. Der Rest der Lösung wurde mit Wasser auf einen Gehalt von 0,6 % SiO₂ verdünnt.

Das SiO₂-Sol mußte im Kühlschrank bei 4 - 6° C aufbewahrt werden; jedoch wurde es auch unter diesen Bedingungen im Verlauf einiger Monate zum Gel (schwaches Opalisieren der Lösung) und somit unbrauchbar.

Die Zugabe eines Chelators wie Na₂EDTA zum Nährmedium ist erforderlich, da ohne Metallpufferung der Zustand der Zellen (Form und Farbe) unnatürlich sein kann (SCHÖNE, 1977).

HUTNER und PROVASOLI (1953) entdeckten, daß durch die Vitaminzusätze zum Nährmedium, besonders von Vitamin B₁₂ (Cobalamin), der Zusatz einer Erd-Abkochung nach SCHREIBER (1927) unterbleiben kann.

In dem oben angegebenen vollsynthetischen Nährmedium gelang die bakterienfreie Massenkultur folgender mariner Phytoplankter:

Chaetoceros didymum EHRENBERG¹⁾

Bellerochea yucatanensis v. STOSCH¹⁾

Chaetoceros debilis CLEVE²⁾

Thalassiosira rotula MEUNIER³⁾

Die Anzucht der Algen erfolgte in 1 l - Glasröhren, die zu 2/3 mit Nährlösung gefüllt waren. Die Kulturröhren standen in einem mit Aluminiumfolie verkleideten Wasserbecken, dessen Temperatur konstant auf $20 \pm 1^{\circ} \text{C}$ mittels eines Thermostaten gehalten werden konnte.

Die optimale Wachstumstemperatur für *Bellerochea yucatanensis* in einer Belüftungskultur liegt bei 34°C (WERNER und ROTH, nach v. STOSCH, 1977). Die Anzuchttemperatur von 20°C wurde gewählt, weil hier die Algen eine Generationszeit von ca. einem Tag (genau 19 Std.) aufwiesen. (s. 3.1.), so daß die Zelldichte der Kulturen durch einmaliges Verdünnen im Verhältnis 1 : 2 pro Tag relativ konstant gehalten werden konnte. Die Verdünnung der Algenkulturen erfolgte jeweils in der Mitte der Lichtphase.

Die Zelldichte der Kulturen betrug $2 - 4 \times 10^6$ Zellen/ml in den Anzuchtröhren, so daß die Algen sich immer in der exponentiellen Wachstumsphase befanden (vgl. 3.1.). Außerdem kommt eine Anzuchtstemperatur von 20°C der ökologischen Wirklichkeit näher als eine Temperatur von 34°C .

-
- 1) wurden mir freundlicherweise von Prof.Dr. H.A.v.Stosch, Marburg/Lahn, zur Verfügung gestellt
 - 2) wurde mir freundlicherweise von Dr. G. Drebes, BAH List/Sylt, zur Verfügung gestellt
 - 3) wurde mir freundlicherweise von Dr. H. Zielke, KFA Jülich, zur Verfügung gestellt

Die Algensuspensionen wurden kontinuierlich mit 500 - 1000 cm³/h Preßluft durchströmt, die vorher durch Aktivkohle und H₂O gefiltert und gereinigt wurde. Die Kultur der Diatomeen erfolgte bei einem Licht/Dunkel-Wechsel von 14 : 10 Std. bei einer Lichtintensität von 1 mW/cm² - entsprach ca. 5000 Lux - in Höhe der Kulturröhren. Die Belichtung geschah mittels Leuchtstoffröhren (Osram, weiß - universal, 40 W/ 25 - 1).

Ferner wurden die Kulturen in der Regel täglich auf eine Bakterien-Kontamination hin mikroskopisch untersucht. Trat eine starke Kontamination auf, mußte die entsprechende Kultur verworfen werden, war die Kontamination jedoch nur gering, gelang es manchmal durch Inkubation der kontaminierten Kultur mit Penicillin G (100 mg/l) und Streptomycin (50 mg/l), nach GUILLARD und RYTHÉ (1962), in "batch"-Kultur für 3 Tage im Dunkeln, die Suspension wieder zu dekontaminieren. Auf die Schwierigkeiten bei der Dekontamination von Diatomeenkulturen mit Hilfe von Antibiotika wiesen auch NEUVILLE und DASTÉ (1979 b) hin.

2.3. DURCHFÜHRUNG DER ¹⁴C-FIXIERUNGSEXPERIMENTE

Die Algen wurden jeweils 2 Std. nach Lichtbeginn abgeerntet. Die Anreicherung der Algen erfolgte mittels Filtration der Diatomeensuspension durch ein Faltenfilter. In diesem Faltenfilter wurden die Algen vor den Fixierungsversuchen auch mit 200 ml frischer Nährlösung gewaschen.

Die beschriebene Anreicherungs-methode erwies sich als gut geeignet für die untersuchte planktische Diatomee, da sowohl durch das häufig angewandte Zentrifugieren als auch durch eine Anreicherung durch Absaugen Zellschädigungen beobachtet werden konnten. Im ersten Fall kam es

häufig zur Zusammenballung des Cytoplasmas durch die auftretenden Zentrifugalkräfte, während beim Absaugen u. U. Zelldeformationen zu beobachten waren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Zellveränderungen einen Einfluß auf den Stoffwechsel der Algen haben könnten.

Mit Hilfe einer THOMA-Zählkammer (Tiefe = 0,05 mm, $0,0025 \text{ mm}^2$) wurde die Zellzahl/ml der angereicherten Diatomeensuspension ermittelt und eine Zellzahl von 20×10^6 Zellen/ml durch Verdünnen der angereicherten Suspension mit Nährlösung eingestellt. Auf diese Weise konnte die Größe der gegenseitigen Beschattung der Zellen bei den Versuchen konstant gehalten werden.

2.3.1. BESTIMMUNG DER GESAMTFIXIERUNGSRATEN

Die Inkubation der Algensuspension mit dem markierten $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ erfolgte in einer eigens für diese Versuche konstruierten Assimilationskammer aus Plexiglas. Die runde Kammer besaß ein Volumen von 15 ml und war von einem temperierbaren Wassermantel umgeben. Sie wurde mittels Klebestreifen auf einem Magnetrührer fixiert, so daß die Algensuspension während des Versuches gerührt werden konnte, und so eine homogene Verteilung der Algenzellen in der Suspension erreicht wurde. Die Begasung mit Aktivkohle-gefilterter Preßluft erfolgte über eine Lochplatte im Boden der Assimilationskammer.

Belichtet wurde die Algensuspension mit Hilfe zweier Projektoren (250 W / 24 V, Quelle, Frankfurt/M.), deren jeweilige Lichtstärke durch Einbringen von Graufiltern (Deutsche Balzers GmbH, Geisenheim) in den Strahlengang auf 1 mW/cm^2 (wie Anzucht! s. 2.2.) in Höhe der Assimilationskammer eingestellt wurde. Die Lichtmessung wurde

mit einem 80 X Opto-Meter (United Detector Technology Inc., USA) durchgeführt.

Als Versuchstemperatur wurde wie bei der Anzucht 20⁰ C gewählt.

Zu Beginn eines Versuches wurden 9 ml der auf 20×10^6 Zellen/ml eingestellten Diatomeensuspension in die Kammer eingefüllt und unter Rühren und Begasen 15 Min. im Licht an die Kammersituation adaptiert. Nach dieser Adaptationszeit wurde 1 ml Nährlösung, in dem sich $20 \mu\text{Ci NaH}^{14}\text{CO}_3$, (spez. Akt.: 56 - 58,3 mCi/mmol) befanden, in die Algensuspension eingespritzt und sofort die Begasung gestoppt; Radioaktivität des $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ in der Suspension : $2 \mu\text{Ci/ml}$. Mit einer einstellbaren Pipette (Pipetman, Gilson, Frankreich) wurden nach 10, 30, 60 Sek. und 2, 4, 6, 8, 10, 20 und 30 Min. je 500 μl der Algensuspension abgezogen und in ein Glas-Szintillationsgläschen gespritzt, in dem sich 4,5 ml essigsaurer Äthanol (Eisessig : Äthanol, 5 : 100; pH ca. 3,5) befanden. Die Abtötung der Algen erfolgte nach BEARDALL et al. (1976).

Die Algenextrakte wurden dann in dem Szintillationsgläschen auf einem 50⁰C-warmen Sandbad mit Preßluft (100 l/h) eingetrocknet, sowie gleichzeitig der nichtfixierte, anorganische radioaktive Kohlenstoff ausgetrieben.

Bei der Überprüfung der Methode ergab sich, daß nach dem Eindampfen nur 0,05 % der eingesetzten Radioaktivität nicht ausgetrieben wurde. Zu dem Rückstand wurden 10 ml Szintillations-Cocktail zugegeben, über Nacht stehen gelassen und dann die Radioaktivität bestimmt.

2.3.2. DURCHFÜHRUNG DER KURZZEIT-FIXIERUNGEN

Die Durchführung der Kurzzeit-Fixierungen erfolgte in der gleichen Weise wie die Bestimmung der Gesamtfixierungsraten mit dem Unterschied, daß hierbei eine 10-fach höhere Konzentration des radioaktiven Bikarbonats eingesetzt wurde, also $20 \mu\text{Ci/ml}$ (spez. Akt.: 56 - 58,3 mCi/mmol).

Da Art und Größe der Exkretion von Photosyntheseprodukten mit erfaßt werden sollte, war es nötig, die Algen vor der Extraktion von der Nährlösung abzutrennen. Dies geschah auf folgende Weise: nach 5, 30, 60 Sek. und 5 Min., bzw. nach 10, 60 Sek. und nach 2 und 10 Min. wurden mit Hilfe einer Spritze 2 ml der Algensuspension abgezogen, auf ein Glasfilter (Whatman, 4,7 cm, GF/C) gespritzt, sofort mittels einer Pumpe abgesaugt und das Filter mit den Algen in ein Becherglas mit 20 ml heißem 80%igen Äthanol überführt. Auf diese Weise wurden die Algen abgetötet und gleichzeitig die Extraktion begonnen.

Es wurde versucht, durch Abtöten der Algen schon in der Spritze die Zeitspanne zwischen Abziehen und Abtötung möglichst zu verringern. Da Alkohol als Extraktionsmittel hierfür ungeeignet ist, wurde ein Fixierungsmittel nach UTERMÖHL (1958) verwendet: 2 g KJ wurden in 4 ml H_2O gelöst, dann 1 g Jod (doppelt sublimiert) zugegeben. Nach Lösung wurden 10 ml H_2O und 1 g Na-Acetat zugegeben.

Jeweils 0,2 ml der 1 : 20 verdünnten Lösung wurden in die Spritze aufgezogen und die Algensuspension schon beim Abziehen aus der Assimilationskammer damit versetzt. Es ergab sich, daß die Algen zwar sofort abgetötet wurden, daß jedoch die Radioaktivität in der Nährlösung deutlich gegenüber den Kontrollwerten ohne direkte Abtötung in der Spritze erhöht war, was auf eine verstärkte Freisetzung von markierten Photosyntheseprodukten schließen ließ.

Also erwies sich das Verfahren für die geplanten Untersuchungen als unbrauchbar.

Die Nährlösung wurde in Zentrifugengläser gesaugt, in denen sich jeweils 0,2 ml der oben angegebenen Fixierungslösung befanden. Auf diese Weise wurde bis zur Weiterverarbeitung der Filtrate ein bakterieller Abbau von verschiedenen Substanzen verhindert.

2.3.3. EXTRAKTION DER PHOTOSYNTHESE-PRODUKTE

Nach Überführung der Filter in den heißen 80%igen Äthanol wurden diese 4 Min. lang darin ausgekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Glasfilter mit Äthanol abgespült, verworfen und die Extrakte abfiltriert. Das in diesem Filter verbliebene Sediment wurde dann mit etwas bidest. H_2O in ein Zentrifugenglas überspült und 5 Min. bei $95^{\circ}C$ im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde wieder abfiltriert und die Filtrate vereinigt.

Das verbliebene Sediment wurde mit Äthanol in ein Glas-Szintillationsgläschen überspült, bei $80^{\circ}C$ im Trockenschrank eingetrocknet, dann mit 10 ml Szintillationscocktail versetzt, und so die Radioaktivität der nicht extrahierbaren Substanzen ermittelt.

Die vereinigten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer bei $40^{\circ}C$ zur Trockene eingeengt, in 300 μl H_2O aufgenommen, zur Abtrennung der Pigmente mit 300 μl Chloroform versetzt und kräftig geschüttelt (vgl. WALLEN und GEEN, 1971 a). Nach der Phasentrennung wurde die obere, wässrige Phase mit Hilfe einer Pasteur-Pipette vorsichtig abgenommen und in 1,5 ml - EPPENDORF - Reaktionsgefäße überführt. Die farblosen Extrakte wurden tiefgefroren aufbewahrt.

Eine dünnschichtchromatographische Auftrennung und Autoradiographie der Chloroform-Phase ergab, daß außer ^{14}C -markierten Pigmenten und Lipiden bzw. deren Abbauprodukten keine anderen markierten Substanzen in diese Phase übergetreten waren. Auch CLARK et al. (1972) wiesen auf die gute Eignung von Chloroform zur quantitativen Ausschüttlung von Pigmenten aus pigmenthaltigen Lösungen hin.

Die ^{14}C -Markierung der Extrakte zeigte innerhalb der 10 Min. einen linearen Verlauf. Die Radioaktivität der nichtextrahierbaren Substanzen betrug nach 10 Min. Photosynthese in keinem Versuch mehr als 9,6 % der Gesamtfixierungsrate.

Die der Äthanol-Extraktion folgende heiße Wasserextraktion der Algen war unbedingt erforderlich, was eine getrennte Aufarbeitung beider Extrakte deutlich machte. So wurden in dem H_2O -Extrakt je nach Fixierungszeit zwischen 12,8 und 41,4 % der Radioaktivität der vereinigten Extrakte gefunden, die sich unterschiedlich auf die verschiedenen Substanzen verteilten: bei Alanin zwischen 5,8 und 28,8 %, bei Glycin/Serin zwischen 29,6 und 66,5 %, bei der gesamten Aminosäurefraktion zwischen 6,6 und 29,6 %. Ganz besonders deutlich wurde die Notwendigkeit einer heißen Wasserextraktion bei Polysacchariden, Zuckermono- und Zuckerbisphosphaten; so fanden sich bei Polysacchariden zwischen 25,5 und 100 % der Radioaktivität beider Extrakte im wäßrigen Extrakt, bei Zuckermonophosphaten zwischen 33,6 und 61,7 % und bei Zuckerbisphosphaten zwischen 23,4 und 100 %.

Aus diesen Befunden wird deutlich, daß für eine vollständige Extraktion aller ^{14}C -markierter Photosyntheseprodukte mariner Diatomeen eine Wasserextraktion unbedingt erforderlich ist. Während eine derartige Extraktion von

KREMER und BERKS (1978) auch durchgeführt wurde, beschränkten sich WALLEN und GEEN (1971 a, b), BEARDALL und MORRIS (1975), BEARDALL et al. (1976) und GLOVER et al. (1975) nur auf eine Äthanolextraktion. Dabei stellte sich die Frage, ob diese Autoren tatsächlich alle Substanzen in vollem Umfang mit Hilfe dieses einen Extraktionsschrittes erfassen konnten. Dies muß auf Grund eigener Erfahrung und Überprüfung allerdings bezweifelt werden.

2.3.4. ERMITTLUNG DER EXKRETION

Die mit der Fixierungslösung nach UTERMÖHL (s.o.) versetzte Nährlösung wurde in 50 ml - Rundkolben umgefüllt, mit 200 μ l 0,1 n HCl angesäuert und bei 50° C mit Preßluft zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 300 μ l H₂O gelöst, in 1,5 ml - EPPENDORF - Reaktionsgefäße überführt und bis zur Aufarbeitung tiefgefroren aufbewahrt.

Zur Flüssigszintillationszählung wurden 10 μ l der eingengten Nährlösung verwandt.

Das Ansäuern der Nährlösung war unbedingt notwendig, da ohne Ansäuern beim Eintrocknen mit Preßluft noch ca. 30 % des eingesetzten NaH¹⁴CO₃ im Rückstand verblieben. Nach Ansäuern konnte nur noch 0,001 % der eingesetzten Radioaktivität nicht ausgetrieben werden. Zur Klärung der Frage, ob durch das Ansäuern - verbunden mit dem Eintrocknen unter Preßluft - u. U. einige Exkretionsprodukte zerstört wurden, wurde bei einigen Filtraten die Hälfte nach MCKINLEY et al. (1977) mit CO₂ eingetrocknet, die andere Hälfte angesäuert und mit Preßluft eingetrocknet. Bei den mit CO₂ eingedampften Filtraten verblieb noch 0,01 % des eingesetzten ¹⁴C-markierten Bikarbonats im Rückstand. Es konnte jedoch keine höhere Radioaktivität in den mit CO₂ eingetrockneten Extrakten festgestellt

werden. Also konnte das Ansäuern mit nachfolgender Eindampfung mit Preßluft beibehalten werden.

2.3.5. AUFTRENNUNG DER EXTRAKTE

Die Auftrennung der Extrakte erfolgte nach der "finger print" - Technik von SCHÜRMANN (1969). Hierbei wurden die ^{14}C -markierten Photosyntheseprodukte zuerst nach ihrer Ladung in einem geeigneten Puffer hochspannungselektrophoretisch, später dann in der zweiten Richtung chromatographisch getrennt.

Als Trägerschicht wurde Cellulosepulver MN 300 HR (Macherey und Nagel, Düren) verwendet. Mit dieser säuregewaschenen und entfetteten Cellulose konnte eine bessere Trennung - besonders der Zuckerphosphate - als mit der normalen Cellulose (MN 300) erzielt werden.

Für 5 Glasplatten (20 x 20 x 0,5 cm) wurden 16 g Cellulosepulver mit 1 ml einer 0,1 M EDTA-Lösung und 100 ml H_2O eine Minute lang in einem Mixer homogenisiert. 20 ml dieser Suspension wurden dann auf eine Glasplatte aufgegossen, verteilt und ca. 6 Stunden bei 80°C im Trockenschrank getrocknet.

Es wurden - je nach Radioaktivität des Extrakts - zwischen 3 und 50 μl Extrakt pro Platte aufgetragen, was 3.000 - 25.000 dpm entsprach. Bei der Auftrennung der Exkretionsprodukte konnten nur 10 μl pro Platte aufgetragen werden, da sonst der relativ hohe Salzgehalt der Extrakte eine befriedigende Trennung der Substanzen unmöglich machte.

Nach dem Auftragen wurden die Celluloseplatten mit einem Puffer (10 ml Pyridin + 35 ml Eisessig in 1 l H₂O; pH 4,0) vorsichtig eingesprüht und sofort die Elektrophorese begonnen. Während des Einsprühens wurde der Startpunkt mit einer Plexiglasscheibe abgedeckt, um ein Auswaschen der Substanzen zu verhindern.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei - 5 bis 0° C, 1350 V, 30 - 40 mA (Pherograph, Hormuth, Wiesloch). Nach 45 Minuten ergab sich unter diesen Bedingungen eine Trennstrecke von etwa 10 cm, die für die Auftrennung der markierten Substanzen ausreichend war.

Eine Überprüfung ergab, daß keine markierten Substanzen zur Anode wanderten.

Nach der Hochspannungselektrophorese in der ersten Richtung wurden die Platten in dem Laufmittel nach METZNER (1962) in der zweiten Richtung entwickelt. Das Laufmittel hatte folgende Zusammensetzung: Butanol - 2 / Ameisensäure / H₂O (6 : 1 : 2, v/v). Es wurde zweimal in der gleichen Richtung chromatographiert: das erste Mal bis zur Hälfte der Plattenhöhe zur Vortrennung der Zuckerphosphate, das zweite Mal bis zu 2/3 der Plattenhöhe.

Die Lokalisierung der markierten Substanzflecken erfolgte mit Hilfe der Autoradiographie. Hierzu wurden Röntgenfilme (Fuji, Japan) zwischen 10 und 17 Tage (bei Exkretionsprodukten: 21 - 25 Tage) lang mit den Dünnschichtplatten in Kontakt gebracht.

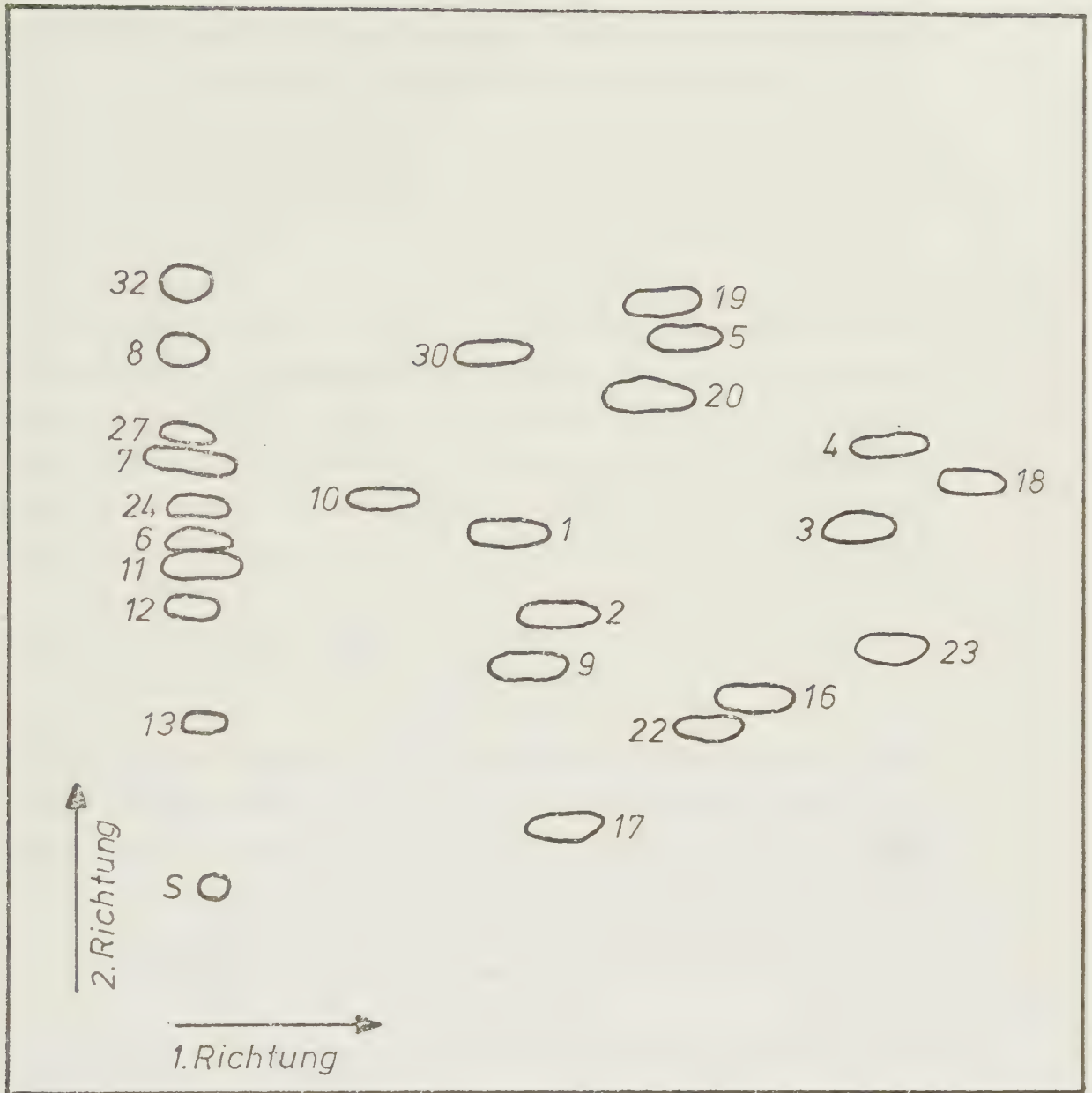


Abb. 2: Verteilungsmuster der ^{14}C -markierten Photosyntheseprodukte. 1. Richtung: Elektrophorese, 2. Richtung: Chromatographie. (1 = Asp, 2 = F-6-P, 3 = PGS, 4 = PEP, 5 = Malat, 6 = Gly, 7 = Ala, 8 = Val, 9 = G-1-P/G-6-P, 10 = Glu, 11 = Ser, 12 = Glu-NH₂, 13 = Asp-NH₂, 16 = FbP, 17 = UBPG, 18 = PGIol, 19 = G1ol, 20 = Gler, 22 = SbP, 23 = RubP, 24 = Threo, 27 = Glycerol, 30 = Succinat, 32 = Ilea, S = Startpunkt = Polysacch.)

2.3.6. IDENTIFIZIERUNG DER MARKIERTEN SUBSTANZEN

Zur Identifizierung der markierten Substanzen wurden die Verteilungsmuster von SCHÜRMANN (1969), PRZYBYLLA (1974) und GLOVER et al. (1975) herangezogen. Mit Hilfe dieser Verteilungsmuster konnten die Substanzflecken aus der relativen Lage zueinander gut identifiziert werden.

Einzelne Substanzflecken mußten auf die Richtigkeit der Benennung hin überprüft werden, bzw. mußte überprüft werden, ob ein Fleck u. U. aus mehreren Substanzen bestand. Da eine Co-Chromatographie mit "kalten" Substanzen besonders bei eng beieinanderliegenden Flecken häufig zu keinem befriedigenden Ergebnis führte, wurde der entsprechende Fleck mit H_2O eluiert und nach der Methode von FEIGE et al. (1969) mit "kalten" Substanzen co-chromatographiert. Parallel erfolgte eine Auftrennung von Vergleichssubstanzen an den Plattenrändern.

Bei der Methode von FEIGE et al. handelt es sich um eine zweidimensionale Chromatographie zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung ^{14}C - und ^{32}P -markierter Stoffwechselprodukte.

Die Laufmittel haben folgende Zusammensetzung:

1. Richtung: Isobuttersäure / n - Butanol / Isopropanol / n - Propanol / H_2O / NH_3 /EDTA
(1000 : 30 : 30 : 140 : 380 : 40 : 0,5;
v/v/v/v/v/v/g)
2. Richtung, 1. Lauf: n - Butanol / n - Propanol / n - Propionsäure / H_2O (400 : 175 : 285 : 373, v/v);
Kammersättigung 3 Std., Laufzeit 5 Std.

2. Richtung, 2. Lauf: n - Butanol / Essigsäure / H₂O
(5 : 1 : 4 v/v, obere Phase) Kammersätti-
gung 3 Std., Laufzeit 5 Std.

Der große Nachteil dieser dünnschichtchromatographischen Trennmethode besteht in der unbefriedigenden Differenzierung von Phosphateestern.

Mit dieser Methode konnte z. B. nachgewiesen werden, daß der Fleck Nr. 20 im Verteilungsmuster - nach GLOVER et al. (1975) als Citrat, nach SCHÜRMANN (1969) als Glycerat bezeichnet - nach 5 Minuten Photosynthese fast ausschließlich aus Glycerat bestand (vgl. Abb. 2).

2.3.7. BESTIMMUNG DER RADIOAKTIVITÄT

Die quantitative Bestimmung der Radioaktivität der einzelnen Substanzflecken wurde nach der Methode von BIELESKI und TURNER (1966) durchgeführt. Hierzu wurden - nach Übertragung des Verteilungsmusters auf die Dünnschichtplatte - 20 ml einer Celluloseacetat-Lösung (33 g Celluloseacetat und 10 g Kampfer in 375 ml Aceton, 125 ml Propanol - (1) und 14 ml Diäthylenglykol gelöst) auf die Platte aufgegossen, mit einem Glasstab gleichmäßig verteilt und mindestens eine Stunde lang die Platten im Abzug getrocknet. Danach konnten die einzelnen Flecken mit einem Skalpell ausgeschnitten und verlustfrei von der Glasplatte abgehoben werden.

Die beschriebene Methode zeichnete sich nicht nur durch eine große Zeitersparnis gegenüber dem zeitaufwendigen Abkratzen der Flecken aus, sondern es ergaben sich bei den markierten Substanzflecken auch besser reproduzierbare Zählraten.

Die ausgeschnittenen Flecken wurden in ein Glas-Szintillationsgläschen mit 10 ml Szintillationscocktail

(0,5 % PPO in Toluol / Äthylenglykolmonomethyläther, 1/1, v/v) überführt und die Radioaktivität mit einem Flüssigszintillations-Spektrometer (Packard Instruments, Tri-Carb 3320) bestimmt.

Es wurden folgende Kanaleinstellungen benutzt:

I. Kanal: window 50 - 1000, gain 8,3 %;

II. Kanal: window 50 - 90, gain 8,3 %.

Die Quenchkorrektur wurde mit Hilfe der Kanalverhältnis-Methode (Kanal II/Kanal I) durchgeführt, die von DAVIDSON und FEIGELSON (1957) zur Quenchkorrektur vorgeschlagen wurde.

Zur Aufstellung einer Korrekturkurve wurden je 50 μ l (entsprachen 24.750 dpm) eines ^{14}C -Toluol-Standards ($5,71 \times 10^5 \pm 3 \%$ dpm/g) zum Szintillationscocktail pipettiert, mit 10 - 100 μ l Aceton versetzt, Kanalverhältnis und Wirkungsgrad bestimmt und die Regressionsgerade berechnet. Als Quencher wurde in Anlehnung an HERBERG (1965) Aceton verwendet, da schon geringe Mengen Aceton eine starke Löschung der emittierten Strahlung bewirken, so daß das Szintillatorvolumen nur unwesentlich verändert wird.

Die Berechnung des Wirkungsgrades aus dem Kanalverhältnis erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Wirkungsgrad} = - 105,6595 \cdot \frac{\text{II}}{\text{I}} + 95,4796 \quad [\%]$$

Mit Hilfe des so errechneten Wirkungsgrades konnten dann die Zerfälle/Min. aus den gemessenen Impulsen/Min. berechnet werden.

RUGE und KACZMARCZYK (1967) sowie BUSH (1963) wiesen darauf hin, daß bei eventuell vorhandenen Farbstoffen im Szintillationscocktail ein Farbstoffmolekül das bereits vom Szintillator emittierte Photon einfangen und der Wirkungsgrad zusätzlich herabgesetzt werden kann. Da bei der Bestimmung der Gesamtfixierungsraten eine Färbung des Szintillationscocktails beobachtet wurde, mußte deshalb für die Farblöschung eine eigene Quenchkorrekturkurve aufgestellt werden. Hierzu wurden je 500 µl Algensuspension unterschiedlicher Zelldichte in Szintillationsgläsern eingetrocknet, in Szintillationscocktail gelöst, je 50 µl des ^{14}C -Toluol-Standards zugegeben, Zählkreisbeute und Kanalverhältnis bestimmt und die Regressionsgerade berechnet.

Die Bestimmung des Wirkungsgrades aus dem Kanalverhältnis für farbgelöschte Proben geschah nach folgender Formel:

$$\text{Wirkungsgrad} = - 134,3587 \cdot \frac{II}{I} + 105,4204 \quad [\%]$$

Wie Abb. 3 zeigt, bestand kein großer Unterschied zwischen beiden Korrekturgeraden. Demnach war die Pigmentkonzentration unter den gegebenen Umständen im Szintillationscocktail zu gering, um eine starke zusätzliche Löschung hervorzurufen.

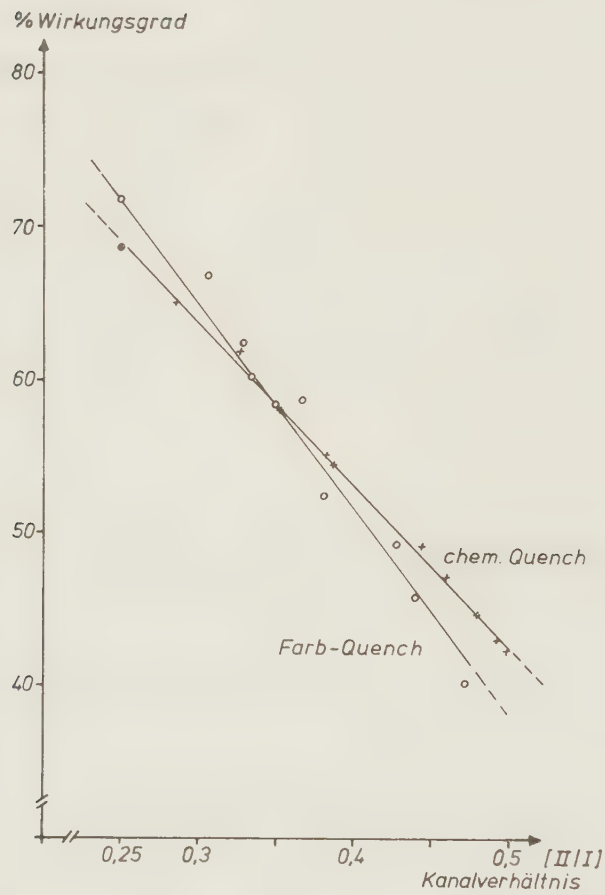


Abb. 3: Quenchkorrekturgeraden für chemische bzw. farbgelöschte ^{14}C -Proben

2.4. DURCHFÜHRUNG DER ENZYM-TESTS

2.4.1. PHOSPHOENOLPYRUVAT-CARBOXYLASE (E.C. 4.1.1. 31)

Die Bestimmung der PEP-Carboxylase-Aktivität wurde nach LORD und MERRETT (1970) durchgeführt.

Zur Herstellung des Rohextrakts wurden die Diatomeen 10 Min. bei 5000 U/Min. (Minifuge, Heraeus-Christ) abzentrifugiert und in einem 0,01 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,8) mit 10 μ M Dithiothreitol aufgenommen (DÖHLER, 1974). Der Aufschluß der Zellen erfolgte dann mittels einer 2-minütigen Ultraschallbehandlung (Sonifier B-12, Branson) der Suspension. Anschließend wurde dieser Zell-extrakt 20 Minuten bei 20.000 U/Min., 4⁰ C, abzentrifugiert (Cryofuge, Heraeus-Christ) und ein Aliquot des klaren Überstandes sofort für den Enzymtest benutzt.

Das Testvolumen betrug 3 ml (Schichtdicke der Küvetten: 1 cm). Im Testansatz waren enthalten: 100 μ mol TRIS-Puffer, pH 8,2, 5 μ mol NaHCO₃, 10 μ mol MgCl₂, 10 μ mol Dithiothreitol, 1 μ mol NADH und Zellextrakt. Der Test wurde mit 5 μ mol PEP gestartet. Die Enzymreaktion wurde bei einer Temperatur von 30⁰ C durchgeführt und bei 366 nm gemessen.

Mit Hilfe des oben beschriebenen Testsystems konnte keine PEP-Carboxylase-Aktivität nachgewiesen werden. Bedingt durch den Testansatz könnte dies auch auf eine zu geringe Malatdehydrogenase-Aktivität im Zellextrakt zurückzuführen sein.

Um dies auszuschließen, wurden zwei weitere Testsysteme ausprobiert, a) nach GLOVER und MORRIS (1978), in dem

das instabile Oxalacetat durch die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase zu Aspartat umgewandelt wird, und b) nach KANAI und EDWARDS (1973) und GUTIERREZ et al. (1974), in dem Malatdehydrogenase zum Testansatz zugegeben wird.

Bei beiden Tests handelt es sich um radiochemische Enzymtests. In beiden Fällen konnte ebenfalls keine PEP-Carboxylase-Aktivität im Zellextrakt nachgewiesen werden. Auch die Zugabe von 2 % Polyvinylpyrrolidon (PVP-40, Sigma, München) zum Extraktionspuffer (nach HATCH und OLIVER, 1975) zur Inaktivierung der o-Diphenol-Oxidase erbrachte kein Ergebnis.

2.4.2. RIBULOSE - 1,5 - BISPHOSPHAT-CARBOXYLASE (E.C. 4.1.1. 39)

Die Aktivität der RubP-Carboxylase wurde nach ANDERSON und FULLER (1969), verändert nach DÖHLER (1974), bei 25° C bestimmt. Nach dem Anreichern der Diatomeen wurden diese in einem 0,01 M TRIS-Puffer, pH 8,2, der 5 µM DTT und 0,15 µM EDTA enthielt, aufgenommen und extrahiert. Die Herstellung des Zellextraktes wurde wie unter 2.4.1. beschrieben durchgeführt.

Der Testansatz enthielt 55 mmol TRIS-Puffer (pH 8,2), 10 mmol MgCl₂, 0,5 mmol DTT, 0,2 mmol EDTA, 2mmol ATP, 25 mmol NaHCO₃, 100 µg Rinderserum-Albumin, 10 µg 3-Phosphoglyceratkinase, 50 µg Glycerinaldehyd - 3 - phosphat-dehydrogenase, 0,25 mmol NADH und Zellextrakt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 0,18 mmol RubP gestartet. Die im Testansatz enthaltenen Hilfsenzyme wurden mittels Sephadex G 50-Säule von Ammoniumsulfat befreit.

Die Extinktionsabnahme wurde bei 366 nm verfolgt.

2.4.3. PHOSPHOENOLPYRUVAT-CARBOXYKINASE (E.C. 4.1.1. 49)

Die Bestimmung der PEP-Carboxykinase-Aktivität erfolgte nach dem Testansatz von HATCH (1973). Die Aktivitätsbestimmung beruht auf der Decarboxylierung von Oxalacetat durch das Enzym, was durch eine Extinktionsabnahme bei 280 nm photometrisch verfolgt werden kann.

Nach dem Anreichern der Algen wurden diese in einem 20 mM HEPES-NaOH-Puffer, pH 7,0, aufgenommen, der 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 2,5 mM $MgCl_2$ und 2,5 mM $MnCl_2$ enthielt. Die Herstellung des Rohextrakts verlief wie unter 2.4.1. beschrieben. Der Testansatz bestand aus 50 mM HEPES-KOH-Puffer, pH 7,0, 1 mM Oxalacetat (in 0,5 mM EDTA gelöst, pH 7,0), 2,5 mM $MgCl_2$, 2,5 mM $MnCl_2$ und 2 Einheiten Pyruvatkinase (Boehringer, Mannheim). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Zellextraktes und 0,2 mM ATP gestartet. Das Testvolumen betrug 3 ml, die Schichtdicke der Küvette 1 cm. Die Enzymreaktion wurde bei einer Temperatur von 20° C verfolgt.

2.5. DURCHFÜHRUNG DER ^{15}N -FIXIERUNGSEXPERIMENTE

2.5.1. GRUNDLAGEN DER ^{15}N -MESSTECHNIK

Neben der massenspektrometrischen Analyse schwerer Isotope wird in zunehmendem Maße zur Analyse des schweren Stickstoffisotops ^{15}N die Emissionsspektrometrie angewandt. Die von FLEISCHMANN (1940) erstmals zum Nachweis der Trennung der Stickstoffisotope ^{14}N und ^{15}N benutzte und später von HOCH und WEISSER (1950) eingehend untersuchte Methode der emissionsspektrometrischen ^{15}N -Analyse zeichnet sich gegenüber der massenspektrometrischen

^{15}N -Analyse vor allem aus durch

1. geringere benötigte Probenmenge,
2. größere Probenfrequenz,
3. relativ einfache Durchführung und
4. geringere Kosten.

Demgegenüber liefert die Massenspektrometrie besonders bei geringen ^{15}N -Anreicherungen die genaueren Analysenwerte.

Die emissionsspektrometrische ^{15}N -Analyse beruht auf einem optischen Isotopieeffekt, auf der Wellenlängenverschiebung von Emissionsbanden des Elektronen-Schwingungsspektrums der isotopen Stickstoffmoleküle. Dieses Spektrum entsteht, wenn im Hochvakuum befindlicher gasförmiger Stickstoff z. B. durch Hochfrequenz zur Lichtemission angeregt wird.

Das Stickstoffmolekül benutzt dabei die ihm zugeführte Energie zum Anheben von Elektronen auf Orbitale höheren Energieinhalts, zur Schwingung der das Molekül bildenden Atome sowie zur Rotation des gesamten Moleküls. Beim Übergang des Moleküls von diesem angeregten (energiereichen) Zustand in den Grundzustand wird Licht emittiert, dessen Energie sich aus einem Elektronenübergangs-, einem Schwingungs- und einem Rotationsanteil zusammensetzt. Da die Energie des Schwingungsanteils stark von der Masse der beteiligten Atome abhängt, wird der u. U. ausgeprägte Isotopieeffekt verständlich.

Zur quantitativen ^{15}N -Analyse bietet sich das System von Rotationsschwingungsbanden an, das dem Elektronenübergang $3 \pi u - 3 \pi g$ der $2 \rightarrow 0$ - Bande entspricht

da hier die Bandenköpfe des Stickstoffspektrums am wenigsten durch Fremdgase (H_2O , CO_2) überlagert werden.

Die Bandenköpfe der isotopen Stickstoffmoleküle haben folgende Emissionsmaxima: $^{14}\text{N}_2$ 2978,8 Å; $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ 2982,8 Å; $^{15}\text{N}_2$ 2988,6 Å. Die Höhen der registrierten Bandenköpfe sind proportional den Häufigkeiten der isotopen Moleküle in der N_2 -Probe und können direkt zur Bestimmung des Atom % ^{15}N herangezogen werden (vgl. Abb.4).

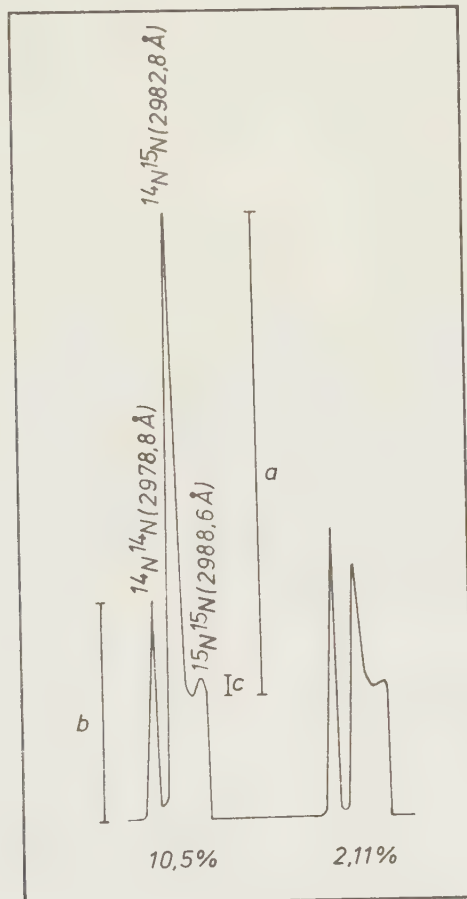


Abb. 4 : Emissionsspektren von N_2 -Proben mit unterschiedlicher ^{15}N -Anreicherung ($V_a = 3000$, $V_b = 300$)

Die Berechnung der Isotopenhäufigkeit basiert auf folgenden Überlegungen und Voraussetzungen:

Da der Stickstoff zwei stabile Isotope (^{14}N und ^{15}N) besitzt, existieren drei N_2 -Moleküle: $^{14}\text{N } ^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N } ^{15}\text{N}$ und $^{15}\text{N } ^{15}\text{N}$. Unter der Voraussetzung einer statistischen Verteilung der beiden Isotope auf die drei N_2 -Molekülarten ist es möglich, für die Bestimmung der relativen Häufigkeit des Isotops ^{15}N das Verhältnis der Häufigkeiten von nur zwei Isotopen Molekülen - in der Regel $^{14}\text{N } ^{14}\text{N}$ und $^{14}\text{N } ^{15}\text{N}$ - zu verwenden.

Wegen der oft sehr unterschiedlichen Isotopenhäufigkeiten muß mit verschiedenen Verstärkungsgraden bei der Registrierung der Banden gearbeitet werden. Bezieht man beide Banden auf einen einheitlichen Verstärkungsgrad, so ergibt sich:

$$R = \frac{b \cdot V_a}{a \cdot V_b} \quad (1)$$

wobei a = Höhe der $^{14}\text{N } ^{14}\text{N}$ - Bande
 b = Höhe der $^{14}\text{N } ^{15}\text{N}$ - Bande
 V_a = Verstärkung der $^{14}\text{N } ^{14}\text{N}$ - Bande
 V_b = Verstärkung der $^{14}\text{N } ^{15}\text{N}$ und der $^{15}\text{N } ^{15}\text{N}$ - Bande

Die relative Häufigkeit c errechnet sich schließlich folgendermaßen:

$$c = \frac{100}{2R + 1} \quad [\text{Atom \% } ^{15}\text{N}] \quad (2)$$

FIEDLER und PROKSCH (1972) schlagen vor, die Formeln (1) und (2) nur für ^{15}N -Gehalte unter 30 Atom % anzuwenden, während für höhere ^{15}N -Gehalte folgende Berechnungen angewandt werden:

$$R' = \frac{b}{c} \quad (3)$$

wobei c = Höhe der ^{15}N ^{15}N - Bande

Die relative Häufigkeit c' ergibt sich dann aus

$$c' = \frac{100}{R/2 + 1} \quad [\text{Atom \% } ^{15}\text{N}] \quad (4)$$

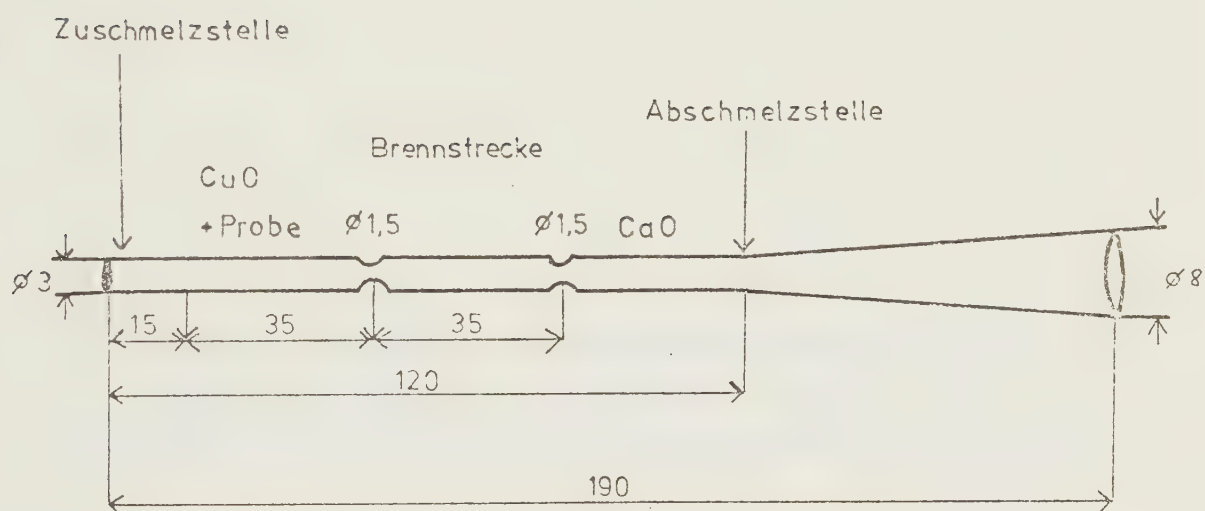


Abb. 5 Entladungsröhrchen nach SCHRÖDER (1980)
(Angabe in mm)

2.5.2. ^{15}N -PROBENCHEMIE

Die Bestimmung der ^{15}N -Häufigkeit wird an molekularem Stickstoff im Vakuum vorgenommen. Hierzu ist es erforderlich, den in anorganischen bzw. organischen Verbindungen vorliegenden Stickstoff in molekularen Stickstoff zu überführen. Die dazu notwendigen Aufarbeitungsschritte werden unter dem Begriff "Probenc Chemie" zusammengefaßt.

Zur Entwicklung des molekularen Stickstoffs im Hochvakuum werden vorrangig zwei Arbeitsmethoden angewandt:

- a) mittels Natriumhypobromid nach RITTENBERG (1948) und FAUST (1965)
- b) mit Kupferoxid/Calciumoxid nach dem Dumas-Verfahren (FAUST, 1967; ROLLE, 1962)

Bei der Umsetzung mit Natriumhypobromid muß der Stickstoff jedoch in Form von NH_4Cl eingesetzt werden, weshalb die N-haltigen Proben vorher einem Kjeldahl-Aufschluß unterzogen werden müssen. Dies ist jedoch bei der N_2 -Entwicklung nach dem Dumas-Verfahren nicht notwendig; hierbei können auch organische stickstoffhaltige Substanzen, z.B. Aminosäuren, direkt eingesetzt werden.

Neben dieser Arbeitserleichterung wird für das Dumas-Verfahren auch eine geringere Probenmenge zur ^{15}N -Analyse benötigt (FAUST, 1967). Aus den geschilderten Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Entwicklung des molekularen Stickstoffs nach dem Dumas-Verfahren angewandt.

In der Abb.5 ist ein Entladungsröhrchen nach SCHRÖDER (1980) dargestellt. Die Röhrchen wurden aus Pyrex- bzw. Duran 50-Glas angefertigt. Normales Glas ist wegen des niedrigen Schmelzpunktes nicht verwendbar.

Da das N_2 -Spektrum im UV-Bereich liegt, wären Quarzröhrchen ideal, wie von PERSCHKE und PROKSCH (1971) benutzt, jedoch ist deren Einsatz bei Routineuntersuchungen zu kostenintensiv.

Kupferoxid und Calciumoxid (zur Absorption von CO_2 und H_2O) wurden im Verhältnis 1 : 1 in das Entladungsröhrchen eingebracht (FAUST, 1967), und zwar je 100 mg. Die Zugabe der Chemikalien erfolgte in gekörnter (CuO) bzw. Bröckchen-Form (CaO), was ein Verstopfen der Kapillaren des Röhrchens verhinderte und auch ein besseres Ausheizen der Chemikalien gewährleistete.

Vor der Verwendung wurde das Kupferoxid 8 Std. im Muffelofen bei $600^{\circ}C$ erhitzt, das Calciumoxid bei $900^{\circ}C$ - wegen der hohen Zersetzungstemperatur des $CaCO_3$ (KUMAZAWA, 1973) - und mit einer Temperatur von $700^{\circ}C$ direkt aus dem Muffelofen in das Entladungsröhrchen eingebracht.

Die mit der Probe und den Chemikalien beschickten Röhrchen wurden dann mittels Picein an den Glasteil der Hochvakuum-Apparatur angebracht und evakuiert (s. Abb. 6).

Während des Evakuierungsprozesses wurden die Röhrchen oberhalb des Probenteils mit einem Sauerstoffbrenner bis zum Auftreten einer gelben Flammenfärbung 3 - 4 mal intensiv ausgeheizt. Der Probenteil mit dem Kupferoxid wurde mit Hilfe eines Föns auf ca. $70^{\circ}C$ erhitzt. Gerade bei geringen Stickstoffmengen ist das gründliche Ausheizen der Röhrchen sowie der Chemikalien zur Entfernung des Luft-Stickstoffs sehr wichtig, worauf FAUST (1967) besonders hinwies.

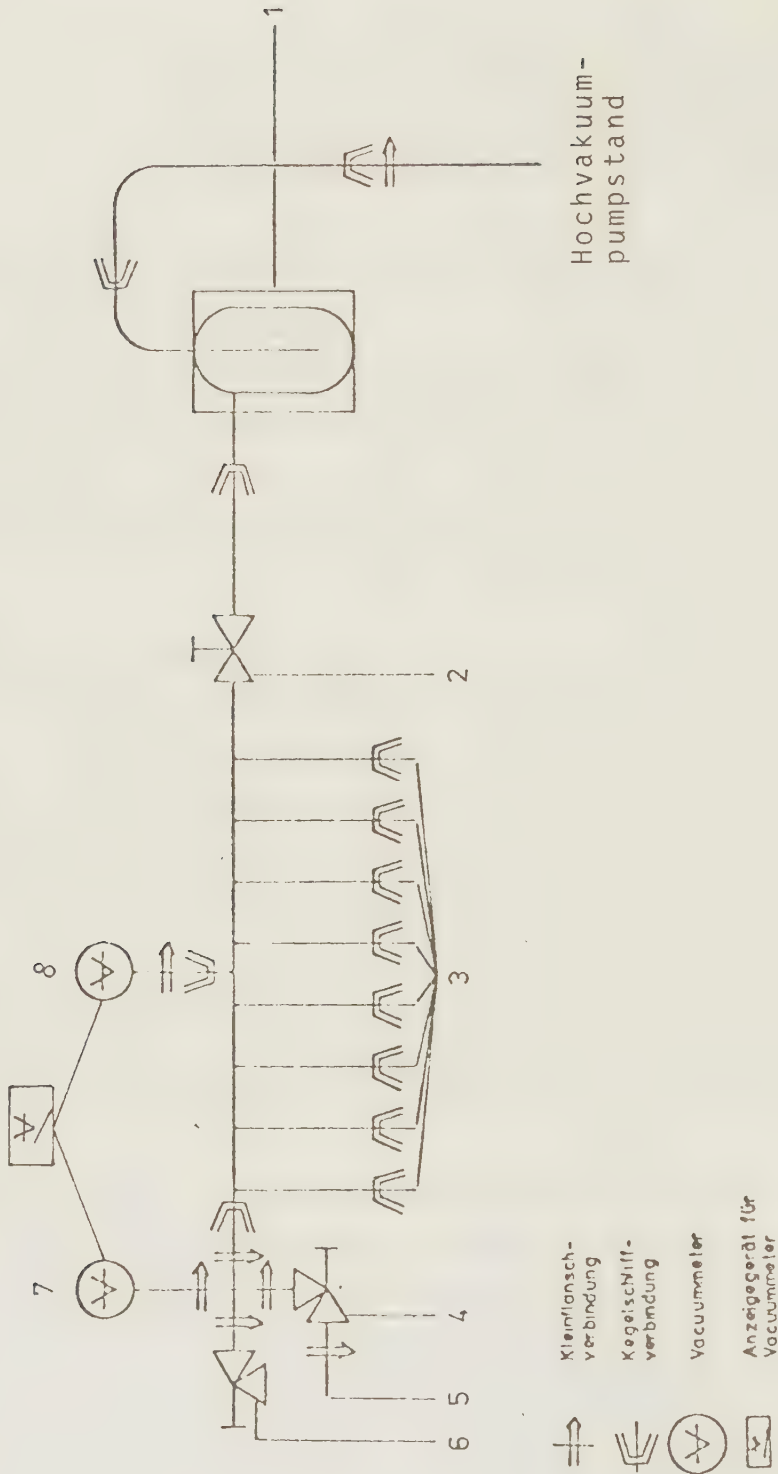


Abb. 6: Aufbau der Hochvakuumanlage für die ^{15}N - Probenchemie (schematisch; verändert nach SCHROEDER, 1980).
 1. = Kühlfalle; 2 = Beutelhahn; 3 = Anschlüsse für Entladungsröhrchen;
 4 = Argon-Einlaßventil; 5 = Penningvac-Meßkopf; 6 = Piezovac-Meßkopf;
 7 = Piezovac-Meßkopf; 8 = Piezovac-Meßkopf

Wie alle Gasentladungen ist auch die Hochfrequenzentladung beim Stickstoffgas druckabhängig. Bei einem Druck von 2 - 4 Torr im Entladungsröhrchen ist die Lichtemission des Stickstoffgases für die ^{15}N -Analyse optimal (FAUST, 1965).

Bei Einsatz sehr geringer Probenmengen reichte die nach der Dumas-Verbrennung entwickelte N_2 -Menge jedoch häufig nicht aus, um einen entsprechenden Innendruck im Röhrchen zu erzeugen. Deshalb wurde in Anlehnung an COOK et al. (1967) Argon (Argon 6.0, Linde, München) in die Entladungsröhrchen eingeleitet, so daß ein Innendruck von 2 - 3 mbar resultierte. Dies geschah in folgender Weise: Nach intensivem Ausheizen und Evakuieren der Entladungsröhrchen auf 5×10^{-5} mbar wurde der Rezipient durch Schließen des Beutelhahns von dem Pumpstand getrennt und der Rezipient mit Argon bei einem Druck von 10 mbar gespült. Nach einigen Minuten wurde der Beutelhahn wieder ein wenig geöffnet und ein Druck von 2 - 3 mbar im Rezipienten eingestellt. Dann wurden die Röhrchen abgeschmolzen.

Nach KUMAZAWA (1973) bewirkte der Edelgaszusatz neben der Einstellung des geeigneten Druckes im Entladungsröhrchen auch eine Stabilisierung der Emissionsintensität.

Von verschiedenen Autoren wurde ein Gemisch von 0,15 Torr Xenon und 10 Torr Helium eingesetzt, was die Emissionsintensität sowie -dauer positiv beeinflussen sollte (z.B. GOLEB und MIDDELBOE, 1968; MUHAMMAD und KUMAZAWA, 1976; YONEYAMA und KUMAZAWA, 1975 a).

Die abgeschmolzenen Röhrchen wurden dann 4 Std. bei 500° im Muffelofen erhitzt und darin abkühlen gelassen, was eine möglichst quantitative Absorption des CO_2 durch das Calciumoxid bewirken sollte.

Die Ermittlung des ^{15}N -Gehalts erfolgte im Anschluß daran wie unter 2.5.1. beschrieben.

Die Reproduzierbarkeit der mit Hilfe der beschriebenen Probenchemie ermittelten ^{15}N -Gehalte betrug bei Einsatz von 500 ng Stickstoff - als $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ eingebracht - ^{15}N -Anreicherung: 4,15 % - $\pm$ 2,5 % (n = 4), bezogen auf das seltene Isotop.

In Tab. 2 sind die emissionsspektrometrisch ermittelten ^{15}N -Gehalte einer Reihe von Eichstandards den massenspektrometrisch bestimmten ^{15}N -Gehalten gegenübergestellt. Die $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ -Standards wurden vom VEB Statron, Leipzig, bezogen.

Pro Entladungsröhrchen wurden 5 μg Stickstoff eingesetzt. Das Einbringen des Ammoniumchlorids erfolgte durch Eintrocknen einer bestimmten Menge einer entsprechend konzentrierten $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung in 20 μl - Glaskapillaren bei 90° C im Trockenschrank. Diese wurden dann in die Entladungsröhrchen eingefüllt.

Es wurde eine solch relativ große N-Menge eingesetzt, um die Isotopenverdünnung der Eichstandards durch an den Glaswänden bzw. den Chemikalien adsorbierten Luft-Stickstoff praktisch auszuschließen. Abweichungen des emissionsspektrometrisch ermittelten ^{15}N -Gehalts vom massenspektrometrisch bestimmten Gehalt konnten so auf die Meßtechnik an sich zurückgeführt werden.

Wie die Gegenüberstellung der Werte in Tab. 2 zeigt, ergaben sich bei geringen ^{15}N -Gehalten erhebliche Abweichungen vom massenspektrometrisch bestimmten Wert. Dies dürfte vor allem durch eine Überlagerung der ^{14}N ^{15}N - Bande durch die ^{14}N ^{14}N - Bande verursacht werden, was einen höheren ^{15}N -Gehalt vortäuscht.

Tab. 2: Vergleich des massenspektrometrisch ermittelten ^{15}N -Gehalts mit dem emissionsspektrometrisch bestimmten Wert von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ -Proben (5 μg N/Entladungsröhrchen; Dumas-Verbrennung)

Massenspekt. [Atom % ^{15}N]	Emissionsspekt. [Atom % ^{15}N]	Differenz Emissionsspekt. - Massenspekt. [%]
0,366 (0,365)	0,5905 (0,545)	+ 61,3 (+ 49,3)
0,718 (0,673)	0,9295 (0,880)	+ 29,5 (+ 30,8)
1,36 (1,412)	1,5679 (1,63)	+ 15,3 (+ 15,6)
2,11	2,3461	+ 11,2
4,15	4,3611	+ 5,1
6,11	6,2959	+ 3,0
8,0	8,1727	+ 2,2
10,5 (10,58)	10,5070 (10,97)	+ 0,07 (+ 3,7)
17,7	16,9949	- 4,0
25,4	28,5098	+ 12,2
36,0	32,1273	- 10,8
50,7	47,331	- 6,6

Werte in (): Analysenwerte nach GUIRAUD und BUSCARLET (1975);
nähere Angaben s. Text!

Bei dem in der vorliegenden Arbeit benutzten NOI-5-Emissionsspektrometer (VEB Statron, Leipzig) wird das zur ^{15}N -Analyse herangezogene monochromatische Licht (s.2.5.1.) mit Hilfe eines 56° NaCl-Prismas erzeugt. Die Werte von GUIRAUD und BUSCARLET (1975) sind mit einem Jasco NIA-1 Analysator ermittelt worden, in dem das monochromatische Licht mit Hilfe eines Beugungsgitters erzeugt wird. Da die Analysenwerte beider Geräte ähnliche Abweichungen vom tatsächlichen (massenspektrometrisch ermittelten) ^{15}N -Gehalt bei geringen ^{15}N -Anreicherungen aufweisen, gelingt offensichtlich mit keinem der beiden optischen Systeme eine deutlich bessere Auflösung der Stickstoffbanden.

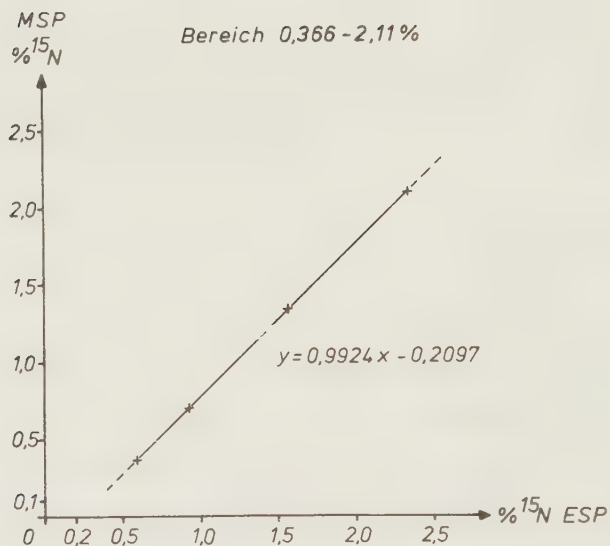


Abb. 7: Eichgerade zur Bestimmung des wahren ^{15}N -Gehalts einer Probe aus dem emissionsspektrometrisch ermittelten ^{15}N -Gehalt

Es muß allerdings erwähnt werden, daß die Gasentwicklung bei den Ergebnissen von GUIRAUD und BUSCARLET mittels der Natriumhypobromid-Methode erfolgte, was aber auf den Analysenwert an sich keinen Einfluß hat (FIEDLER und PROKSCH, 1972).

Die emissionsspektrometrisch ermittelten Werte mußten also mit Hilfe einer Eichkurve korrigiert werden. In Anlehnung an GUIRAUD und BUSCARLET (1975) wurden drei Eichkurven

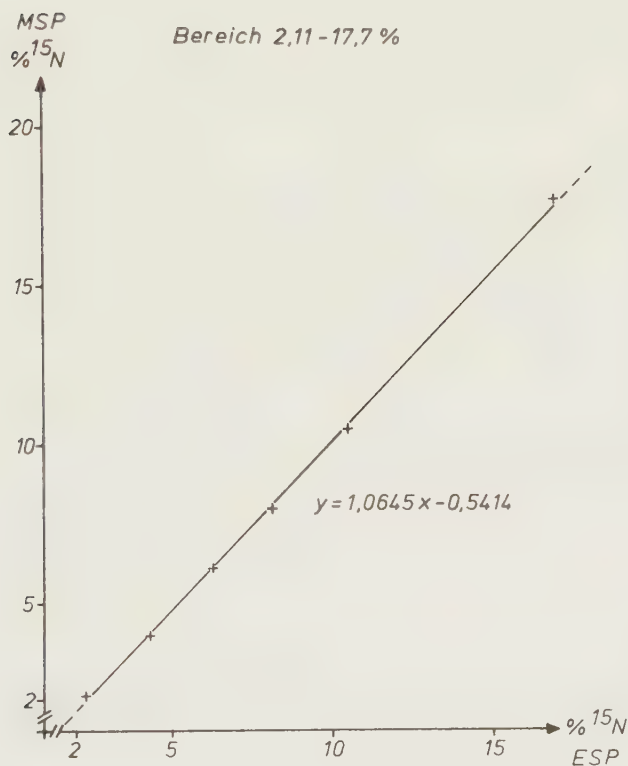


Abb. 8: Eichgerade zur Bestimmung des wahren ¹⁵N-Gehalts einer Probe aus dem emissionsspektrometrisch ermittelten ¹⁵N-Gehalt

und zwar für die Bereiche 0,366 - 2,11, 2,11 - 17,7 und 17,7 - 50,7 Atom % ^{15}N erstellt, was eine bestmögliche Angleichung des korrigierten Wertes an den tatsächlichen ^{15}N -Gehalt gewährleistet (s. Abb. 7 - 9).

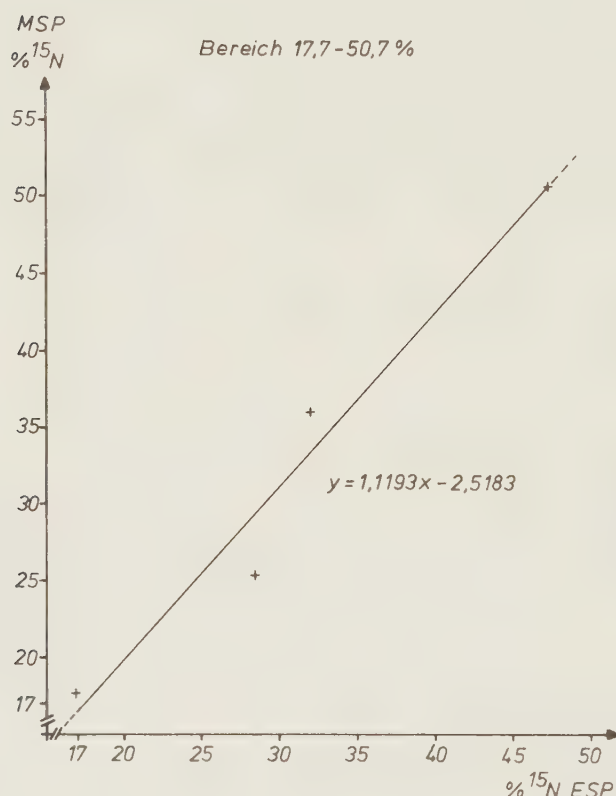


Abb. 9: Eichgerade zur Bestimmung des wahren ^{15}N -Gehalts einer Probe aus dem emissionsspektrometrisch ermittelten ^{15}N -Gehalt

Die Berechnung der ^{15}N -Anreicherung einer Probe erfolgte mit Hilfe der Regressionsgeraden auf folgende Weise:

für den Bereich 0,366 - 2,11 % :

$$\text{Atom \% } ^{15}\text{N-Anreicherung} = 0,9924 \cdot ^{15}\text{N}_{\text{ESP}} - 0,5747$$

für den Bereich 2,11 - 17,7 % :

$$\text{Atom \% } ^{15}\text{N-Anreicherung} = 1,0645 \cdot ^{15}\text{N}_{\text{ESP}} - 0,9064$$

für den Bereich 17,7 - 50,7 % :

Atom % ^{15}N -Anreicherung = 1,1193 . $^{15}\text{N}_{\text{ESP}}$ - 2,8833

Die natürliche relative Häufigkeit des ^{15}N wurde hierbei mit 0,365 % angenommen (WETZEL, 1974).

2.5.3. INKUBATION DER DIATOMEEN MIT ^{15}N -NITRAT BZW. ^{15}N -AMMONIUM

Die Durchführung der ^{15}N -Markierungsversuche erfolgte unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bei den $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungsexperimenten beschrieben (s. 2.3.2.). Allerdings wurden die Algen vor Versuchsbeginn in N-freier Nährlösung aufgenommen, um eine Isotopenverdünnung des markierten Stickstoffs auszuschließen.

Zur Untersuchung des N-Assimilationsweges wurden die Algen (mit NO_3^- als N-Quelle angezogen) dann 15 Min. in der Assimilationskammer vorbelichtet und danach der markierte Stickstoff in Form von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Anreicherung: 96 %; Endkonzentration: 1 mM) gleichzeitig mit ^{14}C -Bikarbonat ($20\text{ }\mu\text{Ci/ml}$) zugegeben. Nach 5, 10, 30, 60 Sekunden und 2, 5 und 10 Minuten wurden je 2 ml der Algen-suspension abgezogen und wie unter 2.3.2. beschrieben abgetötet und extrahiert.

Für eine andere Versuchsserie wurden die Diatomeen 24 Std. in eine N-freie Nährlösung umgesetzt, vor Versuchsbeginn mit N-freier Nährlösung gewaschen und in N-freier Nährlösung 15 Minuten in der Assimilationskammer belichtet. Danach erfolgte die Zugabe des ^{15}N -markierten Stickstoffs in Form von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Anreicherung: 96 %) bzw. K^{15}NO_3 (Anreicherung: 96,8 %). Die Konzentra-

tion beider N-Quellen betrug 1 mM in der Nährlösung. Nach 30 Sekunden und 2, 10 und 30 Minuten wurden je 2 ml der Algensuspension abgezogen und wie oben beschrieben abgetötet und extrahiert.

Parallel wurde die Gesamt- ^{15}N -Aufnahmerate der Algen an einem 60 mm^2 großen Filterscheibchen zur jeweiligen Fixierungszeit bestimmt.

Die ^{15}N -markierten Verbindungen wurden über die Rohstoffeinfuhr, Düsseldorf, bezogen.

2.5.4. AUFTRENNUNG DER AMINOSÄUREN

Die Auftrennung der Aminosäuren erfolgte mittels zweidimensionaler Chromatographie auf Cellulose-Dünnschichtplatten (MN 300 HR, Macherey und Nagel, Düren), die wie unter 2.3.5. beschrieben hergestellt wurden (jedoch ohne EDTA-Zusatz!).

Die Laufmittel hatten folgende Zusammensetzung:

1. Richtung, 1. Lauf: Äthanol/Butanol -2/ H_2O /Propionsäure
(10 : 10 : 5 : 2, v/v)

2. Richtung Propanol -1/ H_2O (7 : 3, v/v)

1. Richtung, 2. Lauf: wie 1. Richtung, 1. Lauf.

(Alle Laufmittel sind N-frei.)

Abb.10 zeigt das Ergebnis der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Aminosäuren eines Algenextraktes.

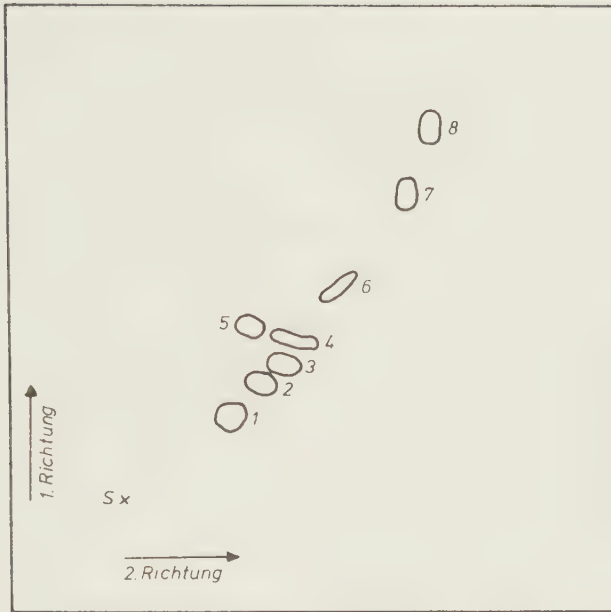


Abb. 10: Verteilungsmuster der identifizierten Aminosäuren (1 = Asp-NH₂, 2 = Glu-NH₂, 3 = Asp, 4 = Gly/Ser, 5 = Glu, 6 = Ala, 7 = Val, 8 = Ileu)

Bei der Trennung der Extrakte mußte ein möglichst befriedigender Kompromiß zwischen der zum Nachweis der interessierenden Aminosäuren notwendigen Auftragsmenge und der möglichst scharfen Differenzierung der einzelnen Flecken gefunden werden, was für jede Versuchsbedingung getestet werden mußte.

2.5.5. IDENTIFIZIERUNG DER AMINOSÄUREN

Zur Identifizierung der Aminosäuren wurde ein ¹⁴C-markierter Algenextrakt auf beschriebene Weise mehrmals dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und ein Verteilungsmuster der markierten Photosyntheseprodukte autoradiographisch ermittelt. Durch Besprühen einer Cellulose-Platte mit Ninhydrin wurde dann die Lage der Amino-

säuren auf der Platte festgestellt und den Flecken auf dem Röntgenfilm zugeordnet.

Die den Aminosäureflecken entsprechenden Bereiche der unbehandelten Platten wurden abgekratzt, eluiert und das Aminosäureeluat nach Beimischen der vermuteten identischen unmarkierten Aminosäure nochmals chromatographiert. Bei deckungsgleicher Lage der markierten und der unmarkierten Aminosäure (Nachweis: Ninhydrin) auf der Dünnschichtplatte galt die Aminosäure als identifiziert.

2.5.6. VORBEREITUNG DER AMINOSÄURE-PROBEN FÜR DIE ^{15}N -MESSUNG

Nach erfolgter dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Extrakte wurden die Platten mit Ninhydrin (0,2 % in Äthanol) eingesprüht und die Farbreaktion durch 20-minütiges Erwärmen der Platten auf 110°C im Trockenschrank durchgeführt.

Da die Ninhydrin-Reaktion über aus der Aminosäure freigesetzten Ammoniak verläuft (MACCALDIN, 1960), bestand die Gefahr eines N-Verlustes. Dies hätte zwar die ^{15}N -Analyse der Aminosäuren mit einem Stickstoffatom nicht beeinflusst, da ja nicht der Gesamt- ^{15}N -Gehalt, sondern nur der prozentuale Anteil des ^{15}N am Gesamt-Stickstoff bestimmt wurde, wohl aber die ^{15}N -Analyse bei den Amiden Asparagin und Glutamin mit möglicher unterschiedlicher Markierung des Amino- bzw. Amidstickstoffs (YONEYAMA und KUMAZAWA, 1975a). Eine vergleichende ^{15}N -Analyse bei mit Hilfe der Autoradiographie bzw. mit Ninhydrin sichtbar gemachtem ^{14}C - und ^{15}N -markiertem Asparagin und Glutamin ergab jedoch für die angefärbten Amide keine deutliche Verminderung des ^{15}N -Gehalts.

KENNEDY (1965) wies darauf hin, daß bei Ninhydrin-Lösungen mit einem pH-Wert von 5 eine Anfärbung der Aminosäuren ohne N-Verlust zu beobachten ist. Der pH-Wert der hier verwendeten äthanolischen Ninhydrin-Lösungen lag bei 4,6 - 5,0, so daß kein Stickstoffverlust zu erwarten war.

Die mittels der Ninhydrin-Reaktion sichtbar gemachten Aminosäureflecken wurden in ein Zentrifugenglas gekratzt, mit 4 ml 50 %igem Methanol versetzt, 15 Minuten lang kräftig geschüttelt (Heidolph-Schüttler), dann die Cellulose abzentrifugiert (5 Min., 2800 g, Christ-Piccolo). Der Überstand wurde dann am Rotationsverdampfer bei 60° C bis auf wenige Tropfen eingeeengt, das Konzentrat mittels einer Hamilton-Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) in kleine Glaskapillaren (Volumen: 20 µl) überführt und bei 90° C im Trockenschrank eingetrocknet. Diese Glaskapillaren wurden dann in die Entladungsröhrchen eingebracht.

Eine Überprüfung der gesamten Extraktbearbeitung - Dünnschichtchromatographie mit nachfolgender Elution und Eintrocknung - mit Hilfe eines ¹⁵N-Glycin-Standards (Anreicherung: 9,8448 %) ergab eine Verminderung des ¹⁵N-Gehalts um 35 % . (Zur Überprüfung der Methode wurden 4,751 µg Glycin eingesetzt, was einem N-Gehalt von 0,8867 µg entsprach.) Die ¹⁵N-Analyse einer entsprechenden Menge des Standards ohne Aufarbeitung ergab eine recht gute Übereinstimmung mit dem eingesetzten ¹⁵N-Gehalt, nämlich 9,1577 ± 0,1099 % (Mittelwert ± Standardabweichung, n = 4), was ein Verlust von nur 7 % bedeutete.

Der relativ große Verlust von 35 % konnte aber weder durch die Ninhydrin-Reaktion noch durch Verunreinigung der (chromatographierten) Cellulose mit N-haltigen Substanzen

- und somit einer Isotopenverdünnung - erklärt werden. Auch durch längeres Extrahieren bzw. durch Extrahieren in der Wärme (60°C) ergab sich keine bessere Ausbeute.

Da die Wiederfindung eines ^{15}N -Gehalts von der eingesetzten N-Menge abhängig war (s. Abb. 11), was auf eine Isotopenverdünnung durch den nicht völlig aus dem Entladungsröhrchen entfernbaren Luftstickstoff zurückzuführen war, konnte der Verlust nur mit einem allgemeinen Aminosäure-Verlust bei der Aufarbeitungsprozedur begründet werden. Dieser Verlust mußte durch entsprechend häufiges Auftrennen der Extrakte und Anreichern der Aminosäuren ausgeglichen werden.

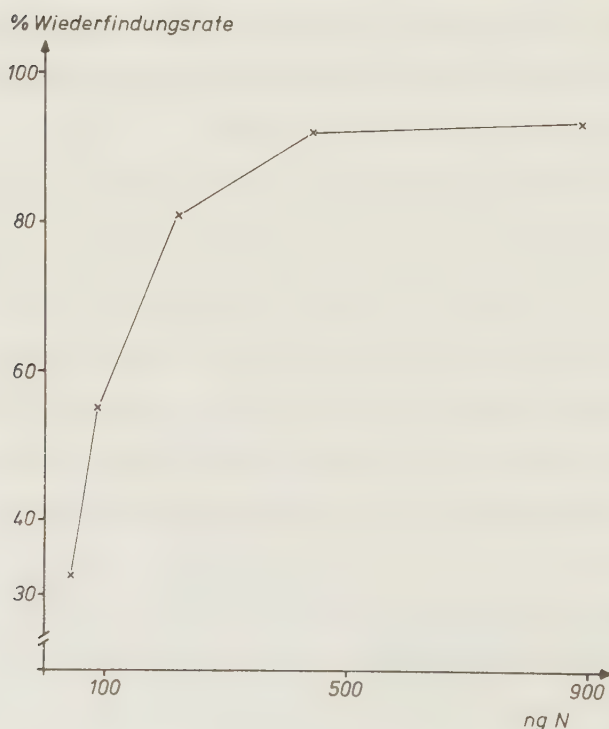


Abb. 11: Wiederfindungsrate eines ^{15}N -Gehalts (9,8448 %) in Abhängigkeit von der eingesetzten N-Menge.

Bei dünnschichtchromatographischer Trennung von Aminosäuren auf Kieselgel-Platten - wie z. B. von ITO und KUMAZAWA (1976) und MUHAMMAD und KUMAZAWA (1976) angewandt - und direktem Einbringen des Kieselgels in das Entladungsröhrchen fand SCHRÖDER (1980) eine 30 %ige Verminderung des eingesetzten ^{15}N -Gehalts. In diesem Fall war die Verminderung des ^{15}N -Gehalts wohl auf eine Isotopenverdünnung durch die an der relativ großen Kieselgel-Oberfläche adsorbierten Luftstickstoff-Moleküle zurückzuführen.

Da dünnschichtchromatographische Methoden zur Trennung ^{15}N -markierter Aminosäuren mit einem relativ großen Verlust behaftet sind, bleibt zu prüfen, wie groß der Verlust bei säulenchromatographischer Trennung der Aminosäuren ist. Ideal wäre die Kombination eines Aminosäure-Analysators mit einem Fraktionssammler und anschließender ^{15}N -Analyse wie von LEWIS (1975) angewandt wurde. Auf diese Weise könnte man auch eine Aussage über die spezifische ^{15}N -Markierung der jeweiligen Aminosäure machen.

2.6. BESTIMMUNG DER POOL-GRÖSSEN DER FREIEN AMINOSÄUREN

Es wurde ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren auf Dünnschichtplatten angewandt, um eine möglichst gute Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die dünnschichtchromatographische Auftrennung der ^{15}N -markierten Aminosäuren zu gewährleisten. Die quantitative Bestimmung der pool-Größen der freien Aminosäuren wurde nach BIELESKI und TURNER (1966) durchgeführt.

Die Herstellung der Extrakte erfolgte wie unter 2.3.3. beschrieben.

In Vorversuchen wurde die zur guten Differenzierung der Flecken maximal auftragbare Extraktmenge ermittelt. Die Herstellung der Dünnschichtplatten sowie die Trennung und Identifizierung der Aminosäuren erfolgte wie unter 2.5.4. beschrieben.

Nach Entwicklung und Trocknung der Platten wurden diese in ein Ninhydrin-Reagenz nach HEILMANN et al. (1957) mit folgender Zusammensetzung getaucht:

100 mg Cadmium-Acetat wurden in 10 ml Wasser gelöst, dann 5 ml Eisessig, 100 ml Aceton und 1 g Ninhydrin zugegeben. (Die einzelnen Komponenten mußten in der angegebenen Reihenfolge zugegeben werden.) Sofort nach dem Eintauchen wurde das Aceton mit Hilfe eines Föns abgedampft.

Danach wurden die Dünnschichtplatten noch für mindestens eine Stunde zur Entfernung des Eisessigs im Abzug belassen. Anschließend wurden die Platten zur maximalen Farbentwicklung der Aminosäureflecken 24 Stunden im Exsikkator über konz. Schwefelsäure und NaOH-Plättchen aufbewahrt. Auf diese Weise fand die Farbreaktion in einer Ammoniak-freien Atmosphäre statt.

Dann wurden die Aminosäureflecken abgekratzt, in ein Zentrifugenglas überführt und mit 4 ml Elutionsmittel (1 % Eisessig und 1 % Cadmium-Acetat in Methanol/Ethylacetat/Wasser, 1/1/1, v/v) 15 Minuten kräftig geschüttelt. (Ohne Zusatz von Cadmium-Acetat war der Farbkomplex in Lösung nicht stabil.)

Nach dem Eluieren wurde die Cellulose abzentrifugiert und der Überstand durch ein Faltenfilter filtriert, um eine klare Farblösung zu erhalten. Die Extinktion der rötlich gefärbten Lösung wurde dann an einem Zeiss-Photometer (Q II) bei 505 nm bestimmt.

Innerhalb von 24 Std. nahm die Farbintensität um 5 % ab. Cellulose-Leerwerte ergaben keine Extinktion bei 505 nm, also mußten die Extinktionen nicht korrigiert werden.

Da die Farbentwicklung in starkem Maße von äußeren Umständen - z. B. Temperatur, Ninhydrin-Charge - abhängig ist, wurde auf jede Dünnschichtplatte vor dem Eintauchvorgang in das Ninhydrin-Reagenz 5 µg Alanin als Standard aufgetragen, die Extinktion bestimmt und die Werte der anderen Aminosäuren entsprechend korrigiert.

Auf Grund der Aminosäure-spezifischen Farbintensität des Nachweises wurden für Alanin, Asparagin, Aspartat, Glutamat, Glutamin, Glycin, Serin, Isoleucin, Leucin, Threonin, Valin eigene Eichkurven erstellt. Hierzu wurden 1,5, 10, 15 µg der Aminosäure auf eine vorchromatographierte Celluloseplatte aufgetragen und die Aminosäurebestimmung wie oben beschrieben durchgeführt. Der Test verlief bis 15 µg Aminosäure linear.

Bei der Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode ergab sich eine Streuung der Einzelwerte von 5,4 % (5 µg Glycin, n = 4). Dieser Wert entsprach dem von BIELESKI und TURNER (1966) und HEILMANN et al. (1957) angegebenen Fehler von 5 % bei Einsatz von 2 µg Aminosäure.

Die in der o.a. Weise erhaltenen Eluate konnten nicht zur ^{15}N -Bestimmung benutzt werden, da durch das Cadmium das Kupferoxid bei 500⁰ C zu metallischem Kupfer reduziert wurde und somit nicht mehr für die Dumas-Verbrennung zur Verfügung stand.

Tab. 3: Regressionsgeraden zur Bestimmung der Aminosäure-Konzentration für den Bereich 1 - 15 μg nach BIELESKI und TURNER (1966)

$$\text{Beispiel: } C_{\text{Ala}} = 12,4277 \cdot E_{505} - 0,1167 \text{ } [\mu\text{g}]$$

Aminosäure	Regressionsgerade
Ala	$y = 12,4277 x - 0,1167$
Asp-NH ₂	$y = 92,3808 x + 0,1286$
Asp	$y = 43,5173 x + 0,0126$
Glu	$y = 14,3347 x + 0,2028$
Glu-NH ₂	$y = 15,1948 x - 0,0487$
Gly	$y = 30,1972 x - 0,1503$
Ser	$y = 12,4527 x - 0,3100$
Ileu	$y = 16,3421 x - 0,2495$
Leu	$y = 16,0739 x - 0,2146$
Threo	$y = 28,1502 x - 0,1109$
Val	$y = 12,2410 x - 0,1760$

2.7. BESTIMMUNG DER BEZUGSGRÖSSEN

2.7.1. PIGMENTBESTIMMUNG

Schon SUBBARAO und PLATT (1969) wiesen darauf hin, daß eine vollständige Extraktion der Pigmente des jeweiligen Phytoplankters nur durch eine geeignete Kombination von Zellaufschlußdauer und Extraktionszeit gewährleistet wird. Vorversuche ergaben, daß für *Bellerochea yucatanensis* eine Ultraschallbehandlung von 90 Sek. mit einer anschließenden Acetonextraktion von 30 Sek. die beste Pigmentausbeute ergab.

Die Bestimmung des Chlorophyll a - und Chlorophyll c - Gehalts der Algenzellen wurde in einem 90%igen Aceton-Extrakt nach JEFFREY und HUMPHREY (1975) durchgeführt:

$$\text{Chl. a} = 11,47 \cdot E_{664} - 0,40 \cdot E_{630}$$

$$\text{Chl. c}_1 + \text{c}_2 = 24,36 \cdot E_{630} - 3,73 \cdot E_{664}$$

Ohne vorausgehende chromatographische Trennung der Carotinoide und deren individueller Bestimmung - wie von WALLEN und GEEN (1971 c) durchgeführt - existiert keine befriedigende Methode zur Bestimmung des Gesamt-Carotinoidgehalts (vgl. PARSONS und STRICKLAND, 1963). Aus diesem Grunde wird häufig exemplarisch der β - Carotingehalt ermittelt; so auch in der vorliegenden Arbeit.

Die Bestimmung des β - Carotingehalts erfolgte in einem 80%igen Acetonextrakt nach MYERS und KRATZ (1955):

$$C = \frac{E_{440}}{\epsilon}$$

wobei ϵ = Extinktionskoeffizient = 200

Neben β -Carotin sind Fucoxanthin, Diadinoxanthin, Diatoxanthin und Neofucoxanthin die wichtigsten Carotinoide bei Diatomeen (STRAIN et al., 1944). Nach PARSONS (1961),

HEALY et al. (1967) und WALLEN und GEEN (1971 c) ist Fucoxanthin das mengenmäßig häufigste Carotinoid.

2.7.2. ERMITTLUNG DER ZELLZAHL

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (Tiefe = 0,05 mm; $0,0025 \text{ mm}^2$). Vor der Zählung wurden die Algensuspensionen mehrere Minuten kräftig geschüttelt, um ein Auseinanderbrechen der Zellketten zu erreichen und so eine statistische Verteilung der Zellen auf die Zählfelder zu gewährleisten.

Auf eine Trockengewichtsbestimmung wurde verzichtet, da eine solche Bestimmung bei marinen Algen infolge der anhaftenden Salze zu keinem genauen Ergebnis führt.

2.7.3. PROTEIN-BESTIMMUNG

Der Aufschluß der Algen erfolgte durch eine 2-minütige Ultraschallbehandlung. Anschließend wurden 2 ml dieses Algenextraktes mit 2 ml 10 %iger Trichloressigsäure versetzt, geschüttelt und so die Proteine ausgefällt. Der Niederschlag wurde 20 Min. bei 4°C , 20.000 U/min (Heraeus Christ, Cryofuge 20-3) abzentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Sediment wurde nach völliger Trocknung (!) in 2 ml 0,1 n NaOH resuspendiert und 0,1 ml dieser Proteinlösung zum Test verwandt.

Die Proteinbestimmung wurde nach BRADFORD (1976) durchgeführt. Das Reagenz wurde folgendermaßen hergestellt: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G - 250 (Sigma, München) wurden in 50 ml Äthanol gelöst, 100 ml 85 %ige Phosphorsäure (w/v) zugegeben und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. 5 ml dieser Farblösung wurden mit 0,1 ml der alka-

lischen Proteinlösung versetzt, geschüttelt und 10 Min. bei Zimmertemperatur reagieren gelassen. Danach wurde die Extinktion bei 578 nm an einem Eppendorf-Photometer bestimmt.

Die erzielten Extinktionswerte konnten an Hand einer Eichkurve in Proteinkonzentrationen umgerechnet werden. Die Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin, gelöst in 0,15 M NaCl-Lösung, erstellt.

Die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Algenextrakte wurde mit Hilfe der Regressionsgeraden auf folgende Weise durchgeführt:

$$C_{\text{Protein}} = \frac{E_{578}}{0,6122} - 0,0063 \text{ [mg/ml]} .$$

Die Regressionsgerade gilt für den Bereich von 0,1 - 1 mg Protein/ml. In diesem Bereich verlief die Eichkurve linear.

3. E R G E B N I S S E

3.1. EINFLUSS DER STICKSTOFFQUELLE AUF DAS WACHSTUM DER DIATOMEEN

Wie Abb. 12 zeigt, verlief das Wachstum beider Kulturen bis zum 5. Tag exponentiell, dann traten die Zellen infolge Nährstoffmangels in die stationäre Wachstumsphase ein, d.h. Zellteilungen fanden nicht mehr statt.

Eine lag-Phase zu Beginn war nicht zu beobachten, da die Inokuli exponentiell-wachsenden Kulturen entnommen wurden.

Die Zellzahlen ergaben keinen Hinweis auf die Beeinflussung der Wachstumsrate durch die unterschiedliche Stickstoffquelle. Dies müßte jedoch durch weitere intensivere Untersuchungen bestätigt werden. PAASCHE (1971) fand ein besseres Wachstum mit Ammonium als Stickstoffquelle bei *Dunaliella tertiolecta*. Demgegenüber wurde von COLLOS und SLAWYK (1979) ein gleich gutes Wachstum von *Skeletonema costatum* bei Anzucht mit Nitrat bzw. Ammonium beschrieben. Auch ANTIA et al. (1975) konnten keinen signifikanten Unterschied in der Wachstumsrate bei Anzucht von *Phaeodactylum tricornutum* mit Nitrat-, bzw. Ammonium-N feststellen.

Die Berechnung der Wachstumsrate - gemessen in der exponentiellen Phase der Zellvermehrung - basiert auf der Exponentialfunktion

$$N_t = N_0 \cdot e^{kt}$$

wobei N_0 = Ausgangszellzahl
 N_t = Zellzahl nach der Zeit t;

k ist die relative Wachstumskonstante und ergibt sich demnach aus

$$k = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}$$

Im vorliegenden Fall war $k = 0,877$.

Aus der relativen Wachstumskonstanten kann die Zahl der Zellteilungen pro Tag (u) errechnet werden:

$$u = \frac{k}{\ln 2} = 0,693$$

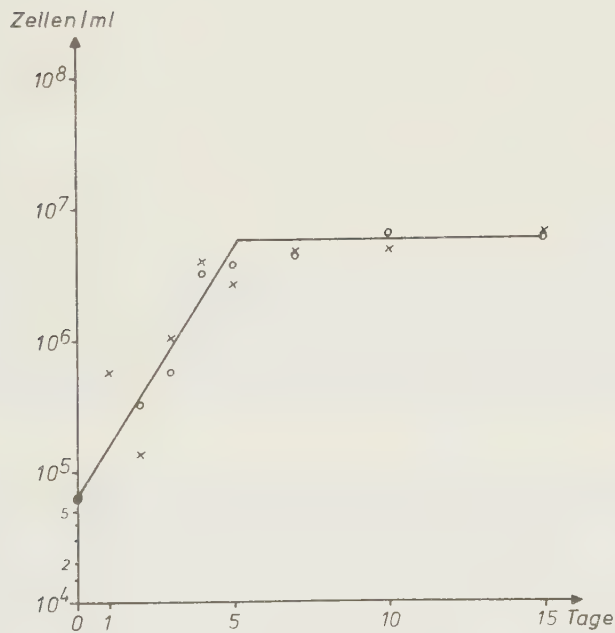


Abb. 12: Wachstumskurve der mit Nitrat (x) bzw. Ammonium (o) angezogenen Diatomeen. Als Inokulum wurden jeweils $6,4 \times 10^4$ Zellen / ml eingesetzt.

Für *Bellerochea yucatanensis* ergab sich unter den beschriebenen Anzuchtbedingungen für μ ein Wert von 1,3, d.h. in der exponentiellen Wachstumsphase wurden 1,3 Zellteilungen pro Tag durchgeführt. Das entsprach einer Generationszeit von ca. 19 Std.

Diese Werte liegen innerhalb der von verschiedenen Autoren angegebenen Daten für marine Diatomeen ($\mu = 0,6 - 6$; nach EPPLEY, 1977). In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß die gewählte Anzuchttemperatur von 20°C nicht als optimal anzusehen ist (s. 2.2.).

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit Diatomeenkulturen durchgeführt, die mindestens drei Wochen an NH_4Cl als Stickstoffquelle adaptiert waren.

3.2. AMMONIUM-INDUZIERTE ÄNDERUNGEN IM PIGMENTGEHALT DER ALGEN

Die unterschiedliche Stickstoffquelle zeigte einen deutlichen Einfluß auf den Gehalt an akzessorischen Pigmenten (β - Carotin, Chlorophyll c) der Diatomeen; bei den mit Ammonium - N angezogenen Algen lagen die Werte um ca. 20 % unter denen der mit Nitrat - N angezogenen Algen (s. Tab. 4)

Der Unterschied im Chlorophyll a - Gehalt war statistisch nicht signifikant. Hier zeigte die unterschiedliche N-Quelle also keinen Einfluß, so daß Chlorophyll a als allgemein gültige Bezugsgröße zur Berechnung herangezogen werden konnte.

Bei Tankexperimenten mit der marinen Diatomee *Ditylum brightwellii* beobachteten STRICKLAND et al. (1969) allerdings eine Verminderung des Chlorophyll a - Gehalts der

Diatomeen bei Wachstum mit Ammonium - N.

Das Verhältnis β - Carotin: Chlorophyll a betrug für die NO_3^- -Algen 1 : 0,85 und lag somit innerhalb des Bereiches von 0,26 - 1,2, der von mehreren Autoren (PARSONS et al., 1961; ANTIA et al., 1963; SLOAN und STRICKLAND, 1966) für das Verhältnis Gesamtcarotinoide : Chlorophyll a angegeben wurde.

Der prozentuale Anteil des Chlorophyll c am Gesamt-Chlorophyllgehalt betrug für die mit Nitrat angezogenen Algen 21 %. Dieser Wert stimmt mit den Ergebnissen von JEFFREY (1972) überein, der einen Anteil von 15 - 31 % bei marinen Diatomeen fand.

Nach den Untersuchungen von JEFFREY (1969) besteht das Chlorophyll c aus zwei Komponenten, c_1 und c_2 , die beide in Diatomeen vorhanden sind. Die Strukturformeln von Chlorophyll c_1 und c_2 wurden von STRAIN et al. (1971) aufgeklärt.

Bei marinen Diatomeen treten beide Chlorophyll c - Komponenten normalerweise im Verhältnis 1 : 1 auf, jedoch wurden auch Verhältnisse von 2 : 1 bzw. 1 : 5 (c_1 : c_2) gefunden (JEFFREY, 1972).

Tab. 4: Vergleich der Pigmentgehalte der mit Nitrat bzw. Ammonium angezogenen Algen.

(Werte in $\mu\text{g}/10^6$ Zellen: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.)

Pigment	NO_3^- -Algen	NH_4^+ -Algen	Signifikanz ^{a)}
β -Carotin	0,4829 $\pm$ 0,1003 (14)	0,3770 $\pm$ 0,0490 (6)	S
Chlorophyll a	0,4126 $\pm$ 0,0806 (14)	0,3562 $\pm$ 0,0417 (6)	NS
Chlorophyll c_1+c_2	0,1068 $\pm$ 0,0231 (15)	0,0856 $\pm$ 0,0319 (8)	S

a) S = signifikant: $1 \% < p \leq 5 \%$; NS = nicht signifikant
in () : Anzahl der Einzelwerte

3.3. EINFLUSS DER STICKSTOFFQUELLE AUF DEN PROTEINGEHALT

Bei der Bestimmung des Proteins ergab sich bei den mit Nitrat angezogenen Algen ein Gehalt von $5,1015 \pm 1,1581 \mu\text{g}/10^6$ Zellen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, $n = 5$). Für die mit Ammonium angezogenen Algen lag der Proteingehalt bei $4,3436 \pm 0,6892 \mu\text{g}/10^6$ Zellen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, $n = 7$). Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant, demnach zeigte die unterschiedliche N-Quelle keinen Einfluß auf den Proteingehalt der Diatomeenzellen, was auch STRICKLAND et al. (1969) bei der marinen Diatomee *Ditylum brightwellii* feststellten. Allerdings fand PAASCHE (1971) bei Anzucht des marinen Flagellaten *Dunaliella tertiolecta* mit NH_4Cl (0,6 mM) als N-Quelle einen um 38 % höheren Proteingehalt der Zellen als bei Anzucht mit Nitrat.

3.4. EINFLUSS DER STICKSTOFFQUELLE AUF DIE POOL-GRÖSSEN DER FREIEN AMINOSÄUREN

Wie Tab. 5 zeigt, war der Asparagin-pool bei den mit NO_3^- als N-Quelle angezogenen Algen am größten, gefolgt vom Glutamat- und Aspartat-pool.

Der Glutamingehalt der Algenzellen lag deutlich unter den pool-Größen der anderen Aminosäuren.

Bei Anzucht der Diatomeen mit NH_4^+ als N-Quelle ergab sich ein erhöhter Gehalt der Zellen an freien Aminosäuren. Besonders markant war der Anstieg bei den Amid-Asparagin und Glutamin, wobei der Gehalt der Diatomeen an Glutamin um das 38,6fache, der Gehalt an Asparagin um das 5,6fache höher als bei den NO_3^- -Algen lag.

Demgegenüber zeigte sich bei den anderen Aminosäure-pools nur eine Erhöhung um das 2,9 - 3,8fache.

Auch bei den NH_4^+ -Algen erreichte der Asparagin-pool den größten Wert, allerdings lag der Wert für den Glutamin-pool in etwa der gleichen Größenordnung.

Bei den marinen Diatomeen *Coscinodiscus concinnus*, *Coscinodiscus grani* und *Biddulphia sinensis* fand KLEINKAUF (1964) als freie Aminosäuren vor allem Alanin, Glutamat und Aspartat.

Tab. 5

Pool-Größen der freien Aminosäuren

Werte in nmol/ μg Chl.a. (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 3)

Aminosäure	NO_3^- -Algen	NH_4^+ -Algen
Asp- NH_2	9,36 $\pm$ 0,76	52,28 $\pm$ 4,60
Glu- NH_2	1,26 $\pm$ 0,15	48,60 $\pm$ 4,26
Asp	8,80 $\pm$ 0,42	33,16 $\pm$ 9,95
Glu	9,07 $\pm$ 0,14	26,32 $\pm$ 3,36
Ala	7,69 $\pm$ 0,45	22,96 $\pm$ 2,42
(Gly ¹⁾)	20,04 $\pm$ 0,15	31,92 $\pm$ 6,53)
(Ser ²⁾)	4,76 $\pm$ 0,06	7,06 $\pm$ 1,75)

1) unter der Voraussetzung, daß der Gly/Ser-Fleck nur aus Glycin bestand

2) unter der Voraussetzung, daß der Gly/Ser-Fleck nur aus Serin bestand

(Valin und Isoleucin waren zwar auch auf der Dünnschichtplatte nachweisbar, jedoch in weitaus geringeren Konzentrationen als die aufgeführten Aminosäuren.)

3.5. EINFLUSS DER STICKSTOFFQUELLE AUF DIE PHOTOSYNTHE- TISCHE CO_2 -FIXIERUNG

3.5.1. EINFLUSS DER STICKSTOFFQUELLE AUF DIE $^{14}\text{CO}_2$ -GESAMT- FIXIERUNGSRATEN DER MIT AMMONIUM BZW. NITRAT ANGE- ZOGENEN DIATOMEEN

Wie Abb. 13 verdeutlicht, war die ^{14}C -Gesamtfixierungsrate bei den mit Ammonium als N-Quelle angezogenen Algen höher als bei den mit Nitrat angezogenen Algen. Die durch Ammonium induzierte Erhöhung betrug ca. 20 %.

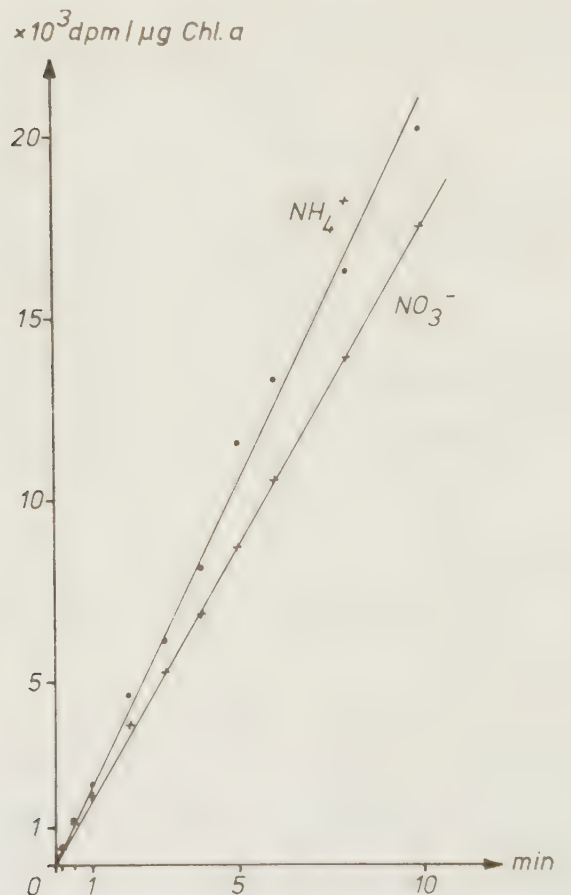


Abb. 13: $^{14}\text{CO}_2$ -Gesamtfixierungsrate der mit Nitrat- bzw. Ammonium-N angezogenen Diatomeen

Ebenso stellten HOLM-HANSEN et al. (1959) bei *Chlorella*, PAASCHE (1971) bei *Dunaliella tertiolecta* und STRICKLAND et al. (1969) bei *Ditylum brightwellii* eine erhöhte Kohlenstoff-Fixierung bei Anzucht mit Ammonium gegenüber Anzucht mit Nitrat fest.

Beide Gesamtfixierungsraten zeigten einen linearen Anstieg innerhalb des untersuchten Zeitraums von 10 Minuten.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen der photosynthetischen Kohlenstoff-Fixierung wurden unter "steady state"-Bedingungen durchgeführt.

3.5.2. VERGLEICH DES ^{14}C -FIXIERUNGSMUSTERS DER MIT AMMONIUM BZW. NITRAT ANGEZOGENEN DIATOMEEN

Bei beiden Anzuchtsbedingungen war schon nach einer Fixierungszeit von 5 Sekunden neben einem ^{14}C -Einbau in Phosphoglycerinsäure, Phosphoenolpyruvat und Zuckerphosphaten ein bemerkenswert hoher prozentualer Anteil - bezogen auf die Gesamtradioaktivität - in Aminosäuren nachzuweisen (s. Tab.6,7). Neben Alanin, Glycin / Serin und Glutamat zeigte vor allem Aspartat schon nach dieser kurzen Fixierungszeit eine relativ hohe ^{14}C -Markierung.

Valin, Isoleucin, Threonin, Glutamin und Asparagin waren erst nach längeren Fixierungszeiten ^{14}C -markiert. Auch nach 10 Minuten konnte nur ein relativ geringer Einbau des markierten Kohlenstoffs in diese Aminosäuren beobachtet werden.

Während nach 5 Sekunden Aspartat den deutlich größten Anteil an der Gesamtfixierung von allen Aminosäuren hatte, zeigte Alanin nach 10 Minuten einen ähnlich hohen pro-

zentualen Anteil am ^{14}C -Einbau wie Aspartat. Bei den mit NO_3^- wie bei den mit NH_4^+ -angezogenen Diatomeen machte der prozentuale Anteil beider Aminosäuren zusammen nach 10 Minuten über 50 % der Gesamtfixierung aus.

Innerhalb der 10-minütigen Versuchsdauer konnte bei Glutamat anteilmäßig die stärkste Zunahme am ^{14}C -Einbau beobachtet werden.

Der prozentuale Anteil von Phosphoglycerinsäure und Phosphoenolpyruvat nahm bei beiden Anzuchtsbedingungen nach längeren Fixierungszeiten in gleicher Weise stark ab; d.h. der Kurvenverlauf war etwa parallel (s. Abb. 14). Dieses Phänomen ist charakteristisch für Kurzzeit-Fixierungsprodukte, worauf auch KREMER und BERKS (1978) schon hinwiesen.

Während im Fixierungsmuster der Aminosäuren bei beiden Anzuchtsbedingungen keine Unterschiede auftraten, konnten aber Unterschiede im prozentualen Anteil der Zuckerphosphate an der Gesamtfixierung beobachtet werden. Bei den mit Ammonium angezogenen Diatomeen hatten die Zuckermorphosphate zu allen Fixierungszeiten einen leicht erhöhten prozentualen Anteil am ^{14}C -Gesamteinbau. Die Zuckermorphosphat-Fraktion setzte sich aus gleichen Teilen von Fructose-6-phosphat und Glucose-1- bzw. Glucose-6-phosphat zusammen, und zwar unabhängig von der Fixierungszeit und der Stickstoffquelle.

Bei den mit Nitrat angezogenen Algen zeigte sich ein fast doppelt so hoher prozentualer Anteil der Zuckerbisphosphate (Fructose-1,6-bisphosphat und Sedoheptulose-1,7-bisphosphat) an der Gesamtfixierung wie bei den mit Ammonium angezogenen Diatomeen. Hier wirkte sich auch die

unterschiedliche Stickstoffquelle auf das Verhältnis der ^{14}C -Markierung von Fructosebisphosphat und Sedoheptulosebisphosphat aus: während bei den mit Nitrat angezogenen Algen ein Verhältnis der ^{14}C -Markierung von FbP : SbP von etwa 1 : 1 auftrat, wiesen die mit Ammonium angezogenen Algen ein Verhältnis von 1 : 0,6 auf. Abgesehen von diesen durch die N-Quelle induzierten Änderungen im Fixierungsmuster ergab sich aber in der Tendenz der Prozentzahlen für beide Anzuchsbedingungen ein ähnliches Bild: einem Maximum nach 30 bzw. 60 Sekunden folgte ein Abfall des prozentualen Anteils der Zuckerbisphosphate nach längeren Fixierungszeiten.

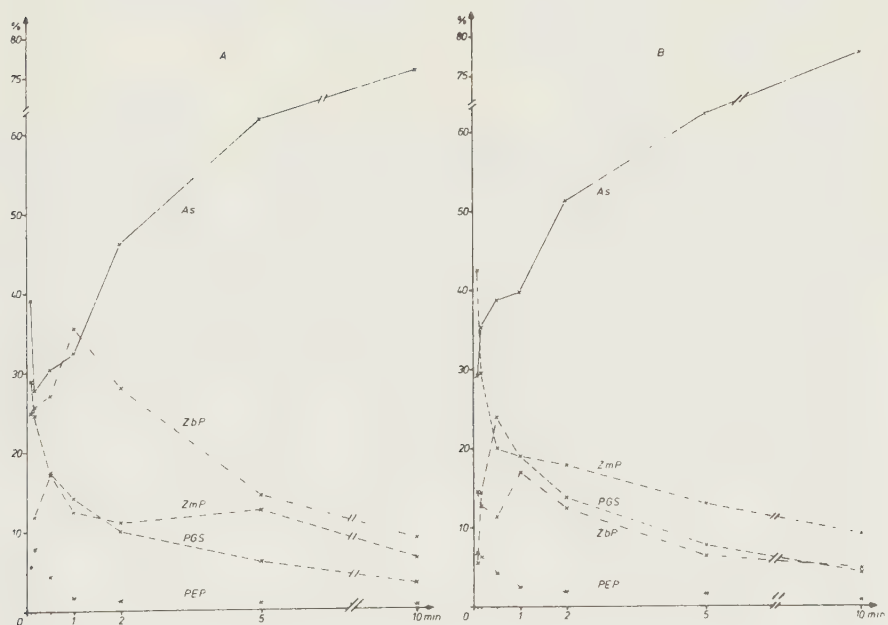


Abb. 14: Vergleich der prozentualen Anteile der Photosyntheseprodukte an der ^{14}C -Gesamtfixierung. (A = mit Nitrat angezogen, B = mit Ammonium angezogen)

Andere ^{14}C -markierte Substanzen sind in Tab. 6 und 7 aufgeführt, z. B. Glycolat, TCA-Zyklus-Intermediate, Glycerat, Polysaccharide und Glycerol.

Diese Substanzen hatten jedoch innerhalb der 10-minütigen Versuchsdauer nur einen unwesentlichen Anteil an der Gesamtfixierungsrate. Bemerkenswert war allerdings der 3fach höhere prozentuale Anteil der Polysaccharidfraktion bei den mit Nitrat angezogenen Algen nach 10 Minuten.

Radioaktiv-markierte freie Zucker konnten nicht nachgewiesen werden.

In Abb. 14 sind die prozentualen Anteile der wichtigsten Substanzen bzw. Substanzgruppen am ^{14}C -Gesamteinbau nochmals graphisch dargestellt. Es zeigt sich, daß innerhalb der Fixierungszeit von 10 Minuten die Aminosäuren gewissermaßen die Endprodukte der photosynthetischen Kohlenstoff-Fixierung darstellen.

Wie schon erwähnt, wiesen die mit Ammonium angezogenen Algen eine höhere ^{14}C -Gesamtfixierungsrate als die mit Nitrat angezogenen Algen auf (vgl. 3.5.1.). Dies war auf einen erhöhten Einbau des radioaktiven Kohlenstoffs in fast alle Photosyntheseprodukte zurückzuführen (s. Tab.8). Nur die ^{14}C -Markierung von Sedoheptulosebisphosphat und der Polysaccharidfraktion zeigte kaum eine Beeinflussung durch die unterschiedliche Stickstoffquelle.

Tab. 6:
Prozentualer Anteil der Photosyntheseprodukte an der ¹⁴C-Gesamtfixierung der mit Nitrat angezogenen Diatomeen

	5 Sek.	10 Sek.	30 Sek.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.
Valin	-	-	1,5	1,4	2,2	3,9	3,9
Isoleucin	-	-	-	0,3	0,5	1,1	0,9
Alanin	11,5	8,9	11,4	4,3	17,1	21,6	27,5
Threonin	-	-	-	-	1,9	0,6	1,1
Glycin/Serin	4,3	3,5	4,7	5,6	4,6	7,3	5,3
Glutamin	-	-	-	-	0,3	0,4	0,8
Asparagin	-	-	-	-	0,5	0,8	1,1
Glutamat	1,8	1,3	1,8	2,3	3,5	8,8	10,7
Aspartat	21,6	14,6	11,2	18,5	17,7	17,3	24,6
Gesamtaminosäuren	39,2	28,3	30,6	32,4	48,3	61,8	75,9
Zuckermonoph.	-	11,9	17,2	12,5	11,1	12,6	6,4
Ribulosebisp.	1,1	1,8	1,4	1,0	0,4	0,5	0,3
Zuckerbisp.	25,0	25,8	27,2	35,6	28,1	14,4	9,0
Uridinbispophogl.	-	-	-	-	-	-	-
Phosphoglycerinsäure	29,0	24,7	17,5	14,2	10,0	6,1	3,3
Phosphoenolpyruvat	5,6	7,9	4,4	1,7	1,2	0,9	0,5
Phosphoglycolat + Glycolat	-	-	-	-	0,3	0,2	0,1
Glycerat	-	-	0,7	0,7	0,6	0,8	0,4
TCA-Zyklus-Interm. ¹⁾	-	-	1,1	0,6	0,5	1,1	0,5
Polysaccharide	-	-	-	0,7	1,1	0,9	2,6
Glycerol	-	-	-	0,4	0,5	0,7	0,6

1) ¹⁴C-markiert waren Malat, Fumarat, Succinat

Tab. 7:
Prozentualer Anteil der Photosyntheseprodukte an der ¹⁴C-Gesamtfixierung der mit Ammonium angezogenen Diatomeen

	5 Sek.	10 Sek.	30 Sek.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.
Valin	-	-	1,4	1,6	2,1	2,5	3,0
Isoleucin	-	-	-	0,4	0,6	0,8	1,0
Alanin	7,0	7,8	10,5	13,2	18,3	19,4	26,8
Threonin	-	-	-	1,5	1,3	1,0	1,3
Glycin/Serin	2,9	5,1	5,6	3,9	5,4	7,2	8,1
Glutamin	-	-	-	-	0,3	0,3	0,5
Asparagin	-	-	-	-	0,4	0,4	0,7
Glutamat	1,1	-	1,3	2,2	3,5	3,9	7,5
Aspartat	18,2	22,5	20,0	17,1	19,6	26,7	28,9
Gesamtaminosäuren	29,2	35,4	38,8	39,9	51,5	62,2	77,8
Zuckermonoph.	5,6	14,5	24,0	19,1	17,9	13,0	9,2
Ribulosebisph.	-	-	0,4	-	-	0,5	-
Zuckerbisph.	14,6	12,9	11,4	17,0	12,4	6,4	4,8
Uridinbisphosphogl.	-	-	-	-	-	2,1	-
Phosphoglycerinsäure	42,6	29,6	20,1	19,0	13,8	7,8	4,3
Phosphoenolpyruvat	6,9	6,4	4,3	2,5	1,9	1,7	0,8
Phosphoglycolat + Glycolat	-	-	-	0,9	0,9	0,3	0,5
TCA-Zyklus-Interm. ¹⁾	-	-	-	0,7	0,4	0,4	0,2
Glycerat	-	1,1	1,1	0,9	1,0	1,6	1,6
Polysaccharide	-	-	-	-	0,4	0,2	0,9
Glycerol	-	-	-	-	-	3,6	0,7

1) s. Tab. 6

Tab. 8: Vergleich der ^{14}C -Markierung verschiedener Photosyntheseprodukte der mit Ammonium bzw. Nitrat angezogenen Diatomeen nach 10 Min. Photosynthese. (Werte in dpm $\times 10^3/\mu\text{g Chl.a}$)

Substanz	NO_3^- -Algen	NH_4^+ -Algen
Aminosäuren	78,7	211,0
F-6-P	3,1	11,8
G-1-P/G-6-P	3,5	13,1
FbP	4,4	8,3
SbP	5,0	4,6
PGS	3,4	11,6
PEP	0,6	2,1
Polysaccharide	2,7	2,4

3.5.3. EINFLUSS DER NITRATKONZENTRATION AUF DIE $^{14}\text{CO}_2$ -GESAMTFIXIERUNGSRATE DER MIT NITRAT ANGEZOGENEN DIATOMEEN

In Abb. 15 ist der Einfluß von verschiedenen Nitratkonzentrationen (1; 3,3; 5; 10 mM) auf die photosynthetische $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung der Diatomeen dargestellt. Die Algen wurden vor Versuchsbeginn 15 Minuten lang in N-freier Nährlösung belichtet, dann erfolgte die Zugabe des markierten Bikarbonats zusammen mit der Stickstoffquelle.

In einem Kontrollversuch wurde die Gesamtfixierungsrate unter den gleichen Versuchsbedingungen in N-freier Nährlösung bestimmt.

Wie die Abbildung zeigt, wurde die ^{14}C -Gesamtfixierung durch das Vorhandensein von Nitrat in der Nährlösung gehemmt. Die negative Korrelation zwischen ^{14}C -Fixierung und N-Konzentration in der Nährlösung ist statistisch nicht signifikant

(Korrelationskoeffizient $r = -0,6008$, $n = 4$).

Dies bedeutet, daß schon durch eine NaNO_3 -Konzentration von 1 mM die maximale Hemmung erreicht wurde; eine Erhöhung der NaNO_3 -Konzentration zeigte keine weitere Auswirkung mehr. Die Anwesenheit von Nitrat in der Nährlösung bewirkte also eine Hemmung der ^{14}C -Fixierung der Diatomeen. Im vorliegenden Fall betrug die Hemmung ca. 25 % gegenüber der Kontrolle.

Die Ergebnisse sind im Einklang mit den Befunden von COLLOS und SLAWYK (1979), die ebenfalls eine Hemmung der Kohlenstoff-Fixierung durch Nitrat zeigten.



Abb. 15: Einfluß der Nitratkonzentration auf die photosynthetische $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung (Mittelwert - Standardabweichung, $n = 9$)

Die beobachtete Hemmung trat aber nur bei Inkubation der Diatomeen (*Skeletonema costatum* und *Phaeodactylum tricornutum*) mit Nitrat auf, nicht bei Inkubation mit Nitrit, Ammonium oder Harnstoff.

Die Autoren fanden auch eine signifikante negative Korrelation zwischen C-Fixierung und NO_3^- -Konzentration bei Konzentrationen von 0,5 - 10 μM , also bei 1000fach geringeren Konzentrationen als bei den hier beschriebenen Versuchen eingesetzt wurden.

3.5.4. EINFLUSS DER AMMONIUMKONZENTRATION AUF DIE $^{14}\text{CO}_2$ -GESAMTFIXIERUNGSRATE DER MIT NITRAT ANGEZOGENEN DIATOMEEN

Abb. 16 zeigt den Einfluß verschiedener Ammonium-Konzentrationen (1, 3, 5, 10 mM) auf die photosynthetische Kohlenstoff-Fixierung der mit Nitrat als N-Quelle angezogenen Algen.

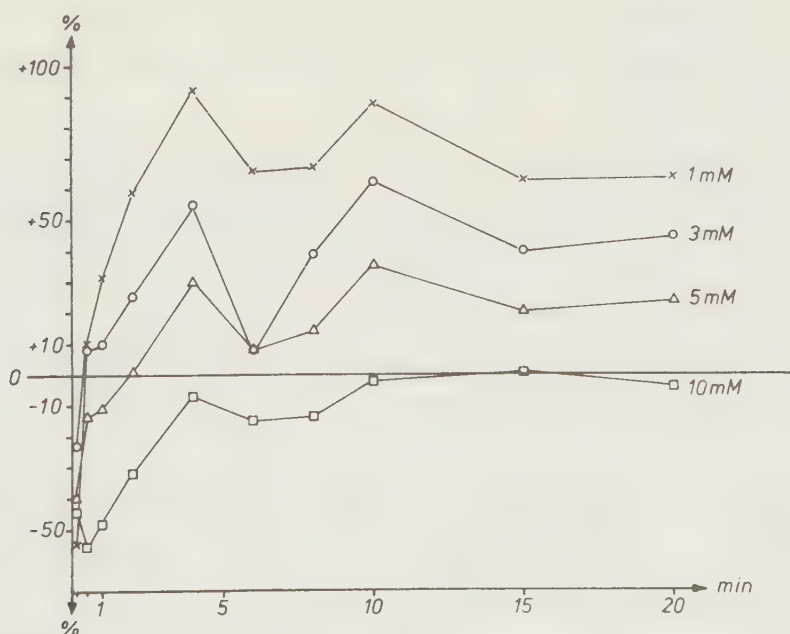


Abb. 16 Einfluß der Ammoniumkonzentration auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Gesamtfixierungsrate der mit Nitrat angezogenen Diatomeen

Direkt nach Zugabe des Ammoniums war eine deutliche Verminderung der ^{14}C -Fixierung bei allen NH_4^+ -Konzentrationen festzustellen. Als "Kontrolle" diente hier die Gesamtfixierungsrate zum jeweiligen Zeitpunkt in NO_3^- -Nährlösung. Bei NH_4^+ -Konzentrationen von 1 und 3 mM erholten sich die Algen - d.h. die ^{14}C -Gesamtfixierungsraten - relativ schnell von dem "Ammonium-Schock", und es war nach 30 Sekunden Inkubationszeit eine signifikante Steigerung der Photosynthese zu beobachten.

Auch bei einer NH_4^+ -Konzentration von 5 mM war nach einer anfänglichen Depression eine Steigerung der ^{14}C -Fixierung festzustellen. Hier wurde die stimulierende Wirkung des Ammoniums allerdings erst nach einer Einwirkungsdauer von 2 Minuten erreicht.

Bei Inkubation mit 10 mM Ammonium dauerte die Depressionsphase bis 10 Minuten an. Nach 10 Minuten wurde aber auch bei dieser NH_4^+ -Konzentration in etwa der Kontrollwert erreicht und die Hemmung der Kohlenstoff-Fixierung aufgehoben.

In der Tendenz zeigten alle eingesetzten NH_4^+ -Konzentrationen einen ähnlichen Einfluß auf die Gesamtfixierungsrate: nach einer anfänglichen Hemmung ergab sich bei 1, 3 und 5 mM eine z. T. recht deutliche Stimulation der ^{14}C -Fixierung, während bei einer Konzentration von 10 mM zumindest die anfangs beobachtete Hemmung so gut wie aufgehoben wurde.

Bemerkenswert war, daß die durch Ammonium stimulierte ^{14}C -Fixierung ein Maximum nach 4 Minuten Inkubationszeit aufwies, dem ein zweites, ungefähr gleich hohes Maximum nach 10-minütiger Inkubation folgte. Dieses Phänomen war bei NH_4^+ -Konzentrationen von 1, 3 und 5 mM zu beobachten, was auf eine Oszillation der photosynthetischen CO_2 -Fixierung der Algen nach NH_4^+ -Zugabe zur Nährlösung hindeutete.

3.5.5. KURZZEITIGE AMMONIUM-INDUZIerte ÄNDERUNGEN DES ^{14}C -FIXIERUNGSMUSTERS DER MIT NITRAT ANGEZOGENEN DIATOMEEN

Wie unter 3.5.4. beschrieben, hatte die Zugabe von Ammonium (1 mM) zur Nährlösung nach einer kurz andauernden Hemmung eine deutliche Steigerung der photosynthetischen CO_2 -Fixierung zur Folge. In Abb. 17 sind die prozentualen Anteile der wichtigsten Substanzen bzw. Substanzgruppen an dem ^{14}C -Gesamteinbau nach Zugabe von 1 mM NH_4Cl dargestellt.



Abb. 17: Prozentualer Anteil der Photosyntheseprodukte an der ^{14}C -Gesamtfixierung der mit Nitrat angezogenen Diatomeen nach Zusatz von Ammonium (1 mM)

In der Tendenz zeigt sich für die dargestellten Photosyntheseprodukte ein ähnliches Bild wie für die ^{14}C -Fixierung der mit NO_3^- bzw. NH_4^+ als Stickstoffquelle angezogenen Diatomeen (vgl. Abb. 14): der prozentuale Anteil an der Gesamtfixierung von Phosphoglycerinsäure, den Zuckerphosphaten und von Phosphoenolpyruvat nahm bei längeren Fixierungszeiten ab, der Anteil der Aminosäuren nahm stark zu. Allerdings war ein noch stärkerer Einbau des fixierten radioaktiven Kohlenstoffs in Aminosäuren festzustellen und ein deutlich verminderter Einbau in die Zuckerphosphate, als das bei den mit NH_4^+ -angezogenen Diatomeen der Fall war. Nach 10 Minuten Photosynthese wurden 90,5 % des fixierten ^{14}C -Bikarbonats in den Aminosäuren gefunden. Während bei den unter 3.5.2. beschriebenen ^{14}C -Fixierungsmustern der prozentuale Anteil von Phosphoglycerinsäure direkt stark abfiel, blieb er hier während der ersten 30 Sekunden in etwa konstant (31,6 - 32,5 - 31,8 %). Danach konnte auch hier eine starke Abnahme beobachtet werden. Diese Zeitspanne von 30 Sekunden entsprach der Dauer der Hemmung der ^{14}C -Gesamtfixierung nach Zugabe von 1 mM NH_4Cl (vgl. Abb. 16).

Tab. 9: ^{14}C -Markierung verschiedener Photosyntheseprodukte nach 10-minütiger Inkubation der Diatomeen (mit NO_3^- -angezogen) mit $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ und 1 mM NH_4Cl (Werte in dpm $\times 10^3/\mu\text{g Chl.a}$)

Substanz	mit NO_3^- angezogen + 1 mM NH_4Cl
Aminosäuren	206,1
F-6-P	2,2
G-1-P/G-6-P	2,0
FbP	2,2
SbP	1,7
PGS	4,0
PEP	0,5
Polysaccharide	0,3

Tab. 9 zeigt die ^{14}C -Markierung der Photosyntheseprodukte nach 10-minütiger Inkubation der Algen mit $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ und 1 mM NH_4Cl . Nach 10 Minuten war ein ähnlich hoher ^{14}C -Einbau in die Aminosäurefraktion festzustellen wie bei den mit NH_4^+ angezogenen Algen ($206,1$ bzw. $211,0 \times 10^3$ dpm/ μg Chl.a; vgl. Tab. 8). Dagegen entsprach der ^{14}C -Einbau in Phosphoglycerinsäure etwa dem ^{14}C -Einbau der mit Nitrat angezogenen Algen ($4,0$ bzw. $3,4 \times 10^3$ dpm/ μg Chl.a). Auch die Radioaktivität von Phosphoenolpyruvat entsprach der der NO_3^- -Algen: $0,5$ bzw. $0,6 \times 10^3$ dpm/ μg Chl.a.

Die ^{14}C -Markierung der übrigen Substanzen bzw. Substanzgruppen war allerdings durch die 10-minütige Ammonium-Einwirkung deutlich vermindert.

Da die Gesamt-Radioaktivität der Aminosäurefraktion der NH_4^+ -Algen entsprach, stellte sich die Frage, ob die ^{14}C -Markierung der einzelnen Aminosäuren ebenfalls übereinstimmte. Während der ^{14}C -Einbau in Valin, Alanin und Asparagin niedriger als der der mit NO_3^- angezogenen Algen war - also durch Ammonium gehemmt wurde -, konnte bei allen anderen Aminosäuren eine höhere Markierung beobachtet werden (s. Tab. 10). In Glycin/Serin und Glutamat konnte ein ähnlich hoher ^{14}C -Einbau wie bei den mit Ammonium angezogenen Algen festgestellt werden. Abgesehen von Isoleucin, zeigten die anderen Aminosäuren, Threonin, Glutamin und Aspartat, einen stärkeren Einbau des radioaktiven Kohlenstoffs in ihr C-Skelett als dies bei den NH_4^+ -Algen der Fall war. Die deutlichste Steigerung war bei Glutamin festzustellen.

Aspartat hatte nach der 10-minütigen Inkubation mit Ammonium den weitaus größten Anteil an der Markierung der Aminosäurefraktion, nämlich 58,3 %.

Tab. 10:
 Ammonium-induzierte Änderungen der ^{14}C -Markierung der Aminosäuren in Abhängigkeit von der Dauer der NH_4^+ -Inkubation nach 10 Min. Photosynthese. (Werte in dpm $\times 10^3/\mu\text{g Chl.a}$)
 I: NO_3^- -Algen II: NO_3^- -Algen nach 10-minütiger Inkubation mit NH_4Cl ; III: NH_4^+ -Algen

Aminosäure	I	II	III
Val	4,0 (5,1 %)	3,2 (1,6 %)	8,1 (3,8 %)
Ileu	1,0 (1,3 %)	1,1 (0,5 %)	2,7 (1,3 %)
Ala	28,5 (36,2 %)	22,5 (10,9 %)	72,7 (34,5 %)
Threo	1,1 (1,4 %)	5,7 (2,8 %)	3,5 (1,7 %)
Gly/Ser	5,5 (7,0 %)	23,7 (11,5 %)	21,9 (10,4 %)
Glu- NH_2	0,8 (1,0 %)	4,8 (2,3 %)	1,4 (0,7 %)
Asp- NH_2	1,2 (1,5 %)	0,5 (0,2 %)	1,8 (0,9 %)
Glu	11,1 (14,1 %)	24,3 (11,8 %)	20,4 (9,7 %)
Asp	25,5 (32,4 %)	120,2 (58,3 %)	78,4 (37,2 %)
	78,7	206,0	210,9

3.5.6. EINFLUSS DER AMMONIUMKONZENTRATION AUF DIE $^{14}\text{CO}_2$ -GESAMTFIXIERUNGSRATE DER MIT AMMONIUM ANGEZOGENEN DIATOMEEN

Ähnlich wie unter 3.5.3. beschrieben, wurden die mit Ammonium als N-Quelle angezogenen Algen 15 Minuten vor Zugabe der jeweiligen NH_4^+ -Konzentration und des radioaktiv markierten Bikarbonats in stickstofffreiem Nährmedium in der Assimilationskammer belichtet.

Sofort nach Zugabe des Ammoniums reagierten die Algen mit einer Erhöhung der photosynthetischen ^{14}C -Fixierung (s. Abb.18). Nach 10 Sekunden Inkubationszeit betrug die beobachtete Steigerung ca. 30 % bei allen eingesetzten NH_4^+ -Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle. (Als "Kontrolle" wird hier die ^{14}C -Gesamtfixierungsrate der Algen in N-freier Nährlösung verstanden.) Bei längerer Inkubation der Algen mit 3, 5 und 10 mM NH_4^+ ging die

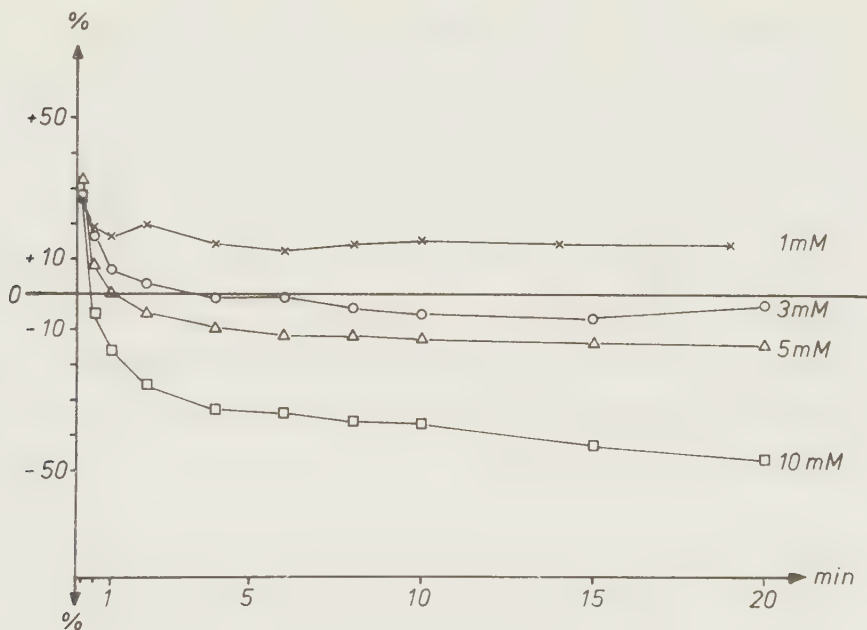


Abb. 18: Einfluß der Ammoniumkonzentration auf die photosynthetische $^{14}\text{CO}_2$ -Gesamtfixierung der mit Ammonium angezogenen Algen

anfängliche Steigerung der C-Fixierung jedoch mehr oder weniger schnell (nach 30 Sek. bis 4 Min) in eine Hemmung über. Die Hemmung der ^{14}C -Fixierung betrug nach 20-minütiger Inkubation bei einer NH_4^+ -Konzentration von 3 mM ca. 5 %, bei 5 mM ca. 15 % und bei 10 mM ca. 45 %, wobei hier der Endwert jedoch noch nicht erreicht worden sein dürfte.

Bei Inkubation der Algen mit einer NH_4^+ -Konzentration von 1 mM (gleiche Konzentration wie in der Nährlösung, s. 2.2.!) wurde im Gegensatz dazu eine 15 %ige Steigerung der ^{14}C -Gesamtfixierung festgestellt.

3.5.7. EINFLUSS DER STICKSTOFFQUELLE AUF DIE AKTIVITÄT DER CO_2 -FIXIERENDEN ENZYME (RubP-CARBOXYLASE, PEP-CARBOXYKINASE)

Bei den mit Nitrat als N-Quelle angezogenen Diatomeen zeigte sich, daß die spezifische Aktivität der RubP-Carboxylase den doppelten Wert der PEP-Carboxykinase erreichte (s. Tab.11). Wurden die Algen aber mit Ammonium (1 mM) angezogen, so trat eine Aktivitätsverminderung der RubP-Carboxylase von 30 % auf. Demgegenüber konnte unter Ammoniumeinfluß eine Verdoppelung der PEP-Carboxykinase-Aktivität beobachtet werden, so daß dieses Enzym in seiner spezifischen Aktivität hier deutlich über der RubP-Carboxylase-Aktivität lag.

Auf Grund der unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten dieser CO_2 -fixierenden Enzyme kann vermutet werden, daß die CO_2 -Fixierung bei den NO_3^- -Algen vor allem mit Hilfe der RubP-Carboxylase verlief, während bei den NH_4^+ -Algen der CO_2 -Einbau über die PEP-Carboxykinase dominierte.

Die CO_2 -Fixierungskapazität beider Enzyme ergab für die NH_4^+ -Algen einen um 20 % höheren Wert als für die NO_3^- -Algen,

Tab. 11: Spezifische Aktivität der CO_2 -fixierenden Enzyme
(Werte in U/mg Protein . h)

Enzym	NO_3^- -Algen	NH_4^+ -Algen
RubP-Carboxylase	1,80 (8)	1,25 (3)
PEP-Carboxykinase	0,92 (3)	2,00 (3)

in (): Anzahl der Einzelwerte

Bei allen *in vitro* bestimmten Enzym-Aktivitäten stellt sich allerdings die Frage, ob diese den *in vivo* - Aktivitäten gleichgesetzt werden können. Dies kann sicher nicht ohne Vorbehalte geschehen.

Eine PEP-Carboxylase-Aktivität konnte bei der untersuchten Diatomee weder nach Anzucht mit Nitrat noch mit Ammonium nachgewiesen werden. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von HOLDSWORTH und BRUCK (1977) und KREMER und BERKS (1978) überein, die ebenfalls in marinen Diatomeen (*Phaeodactylum tricornutum*, *Cyclotella meneghiniana*) keine PEP-Carboxylase-Aktivität fanden, dafür aber eine bemerkenswerte PEP-Carboxykinase-Aktivität nachwiesen.

In krassem Widerspruch dazu stehen allerdings die Ergebnisse von BEARDALL et al. (1976), GLOVER und MORRIS (1979) und MUKERJI und MORRIS (1976). Diese Autoren fanden eine PEP-Carboxylase-Aktivität in den von ihnen getesteten marinen Diatomeen (*Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Coscinodiscus spec.*, *Thalassiosira pseudonana*), die oftmals sogar höher als die der RubP-Carboxylase-Aktivität war. Wie diese widersprüchlichen Ergebnisse zu erklären sind, ist unklar.

3.6. EXKRETION ^{14}C -MARKIERTER PHOTOSYNTHESEPRODUKTE

Eine meßbare Exkretion markierter Substanzen war erst nach einer Fixierungszeit von 10 Minuten festzustellen. Doch auch nach 10 Minuten hatten die ausgeschiedenen Substanzen bei keiner Versuchsbedingung einen höheren Anteil als 1,5 % an der Gesamtfixierungsrate. (Unter "Gesamtfixierungsrate" wird hier die Summe von Exkretion und extrahierbaren ^{14}C -Fixierungsprodukten verstanden.)

Als Exkretionsprodukte traten ausschließlich Aminosäuren auf, und zwar Alanin, Glutamat, Aspartat und Glycin/Serin, also Aminosäuren, die auch einen großen Anteil an der Markierung der aus ganzen Zellen extrahierbaren Photosyntheseprodukten hatten.

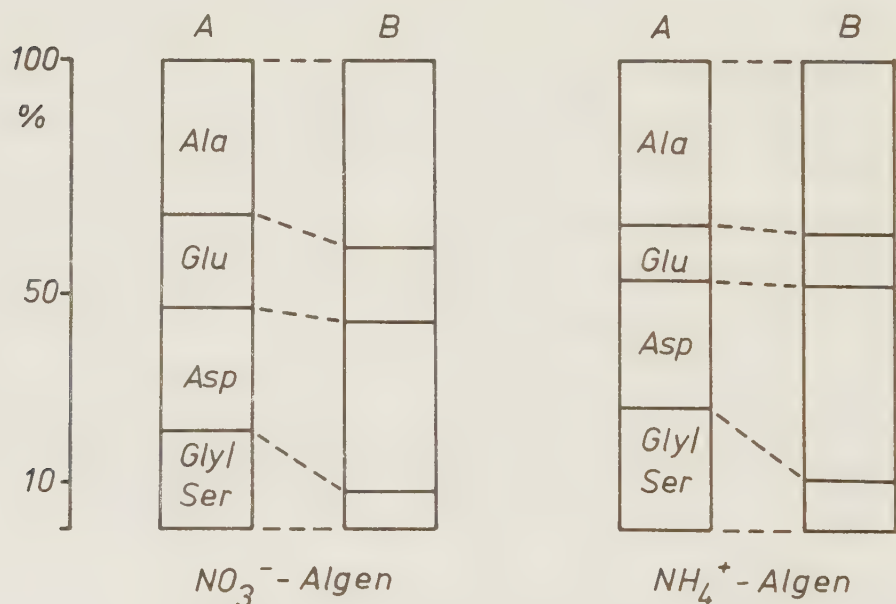


Abb. 19: Vergleich des prozentualen Anteils der ausgeschiedenen Aminosäuren an der Exkretion mit dem Anteil der entsprechenden Aminosäuren am Zellinhalt (A = Exkretion, B = Zellinhalt)

In Abb. 19 ist ein Vergleich des prozentualen Anteils der jeweiligen Aminosäuren an der Exkretion bzw. der Summe der Einzelaktivitäten innerhalb der Zellen angegeben. Bei den mit Nitrat als N-Quelle angezogenen Algen ebenso wie bei den mit Ammonium als N-Quelle angezogenen Algen hatte Alanin den prozentual höchsten Anteil an den ausgeschiedenen Aminosäuren. Der hohe Anteil von Alanin an der Exkretion entsprach jedoch in etwa dem hohen Alaninanteil an der Summe der Einzelaktivitäten der 5 Aminosäuren in den Algenzellen.

Der Glutamatanteil lag bei den mit Nitrat angezogenen Algen zwar höher als bei den NH_4^+ -Algen, jedoch war in beiden Fällen der prozentuale Anteil an der Exkretion wie am Einbau ungefähr gleich.

Deutliche Unterschiede zwischen ausgeschiedenen Produkten und solchen der Zelle ergaben sich bei Aspartat und Glycin/Serin. Während der Anteil von Aspartat relativ gering war, betrug der Glycin/Serin-Anteil an der Gesamtexkretion ungefähr das Doppelte des Anteils von aus ganzen Zellen extrahierten Substanzen. Bei beiden Kulturen konnte dies beobachtet werden.

Glykolat war auch bei schonender Aufarbeitung des Filtrats (s. 2.3.4.) als Exkretionsprodukt sogar nach 10 Minuten nicht nachweisbar.

Ein Platzen der Zellen während des Absaugvorganges ist nicht völlig auszuschließen, da die im Filtrat auftretenden Aminosäuren nach 10 Minuten Inkubation mit radioaktivem Kohlenstoff auch beim Extrahieren ganzer Zellen die höchste ^{14}C -Markierung aufwiesen. Allerdings sprechen der Anteil der Gesamtexkretion von höchstens 1,5 % an der Gesamtfixierung sowie die Unterschiede in der Verteilung

der Radioaktivität zwischen Exkretion und Zellinhalt bei Aspartat und Glycin/Serin für einen - wenn überhaupt - nur unwesentlichen Anteil von Produkten aus geplatzten Zellen.

3.7. UNTERSUCHUNGEN ZUR STICKSTOFF-ASSIMILATION

3.7.1. PARALLEL-FIXIERUNG VON ^{14}C -BIKARBONAT UND ^{15}N -AMMONIUM

Schon nach einer Inkubationszeit von 10 Sekunden war eine ^{15}N -Markierung in Glutamin nachweisbar (s. Abb.20). Die Glutamin-Fraktion zeigte auch bei den längeren Untersuchungszeiten deutlich die höchste ^{15}N -Anreicherung von den ^{15}N -markierten Aminosäuren.

Demgegenüber konnte erst nach 2 Minuten ein ^{14}C -Einbau in Glutamin festgestellt werden (s. Tab.12). Alanin, Glycin/Serin, Glutamat und Aspartat waren schon nach der Fixierungszeit von 5 Sekunden ^{14}C -markiert, jedoch konnte ein ^{15}N -Einbau in Glutamat und Alanin erst nach 1 Minute, ein ^{15}N -Einbau in Glycin/Serin und Aspartat sogar erst nach 2 Minuten beobachtet werden. Nach 5 Minuten trat dann ^{14}C - wie ^{15}N -markiertes Asparagin parallel auf.

Abgesehen vom Glutamin-pool wies der Aspartat-pool nach 10 Minuten von allen Aminosäuren die höchste ^{15}N -Anreicherung auf. Parallel dazu war der ^{14}C -Einbau in Aspartat zu allen Fixierungszeiten am größten.

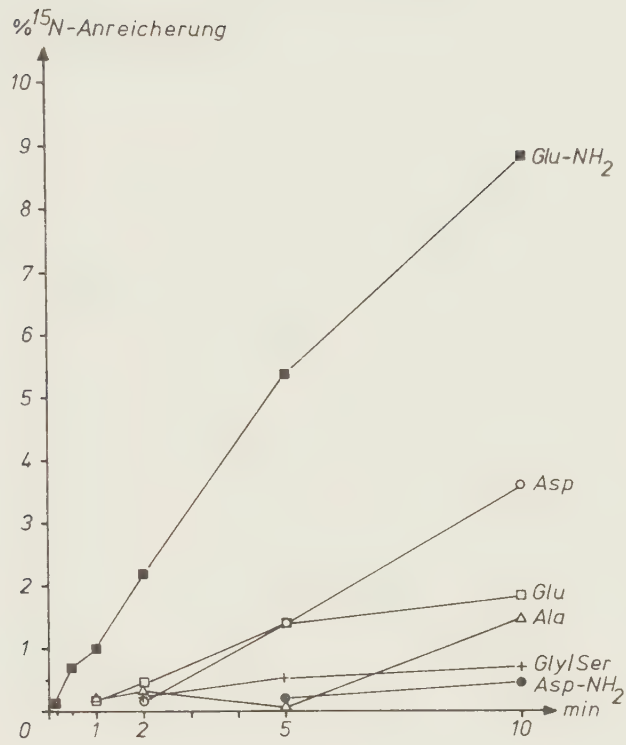


Abb. 20: Atom % ^{15}N -Anreicherung der Aminosäuren nach Inkubation der Diatomeen mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$.

Tab. 12: ¹⁴C- und ¹⁵N-Markierung der Aminosäuren (gleichzeitige Zugabe von NaH¹⁴CO₃ und ¹⁵NH₄Cl)
Werte in dpm x 10³/μg Chl.a; Werte in (): Atom % ¹⁵N-Anreicherung

Aminosäure	5 Sek.	10 Sek.	30 Sek.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.
Val ¹⁾	-	-	-	0,17	0,53	1,05	2,68
Ileu ¹⁾	-	-	-	0,03	0,12	0,33	1,06
Ala	0,09	0,18	0,54	2,16 (0,177)	4,48 (0,254)	8,43 (0,103)	20,26 (1,468)
Threo ¹⁾	-	-	-	-	0,30	0,99	5,03
Gly/Ser	0,06	0,09	0,25	1,03	2,67 (0,230)	7,94 (0,513)	27,94 (0,702)
Glu-NH ₂	-	(0,144)	(0,711)	(1,052)	0,13 (2,206)	0,82 (5,410)	4,28 (8,874)
Asp-NH ₂	-	-	-	-	-	0,15 (0,209)	0,51 (0,463)
Glu	0,02	0,02	0,11	0,47 (0,154)	1,73 (0,465)	6,19 (1,427)	20,91 (1,833)
Asp	0,13	0,26	0,95	4,56	13,27 (0,174)	34,78 (1,427)	104,28 (3,610)

1) ¹⁵N-Anreicherung wurde nicht bestimmt

3.7.2. EINFLUSS DER STICKSTOFFQUELLE AUF DEN ^{14}C -EINBAU IN DIE AMINOSÄUREN DER MIT AMMONIUM ANGEZOGENEN DIATOMEEN

Die mit NH_4^+ angezogenen Algen wurden 15 Minuten in N-freier Nährlösung in der Assimilationskammer belichtet, dann erfolgte die Zugabe des radioaktiven Bikarbonats zusammen mit der Stickstoffquelle.

Wurde die photosynthetische ^{14}C -Fixierung in die Aminosäuren nach Zugabe von 1 mM NH_4Cl bestimmt, so ergab sich eine deutliche Zunahme der Radioaktivität der Aminosäuren im Vergleich zur ^{14}C -Markierung der Aminosäuren in N-freier Nährlösung. Der erhöhte ^{14}C -Einbau konnte bei allen Aminosäuren gleichermaßen beobachtet werden (s. Tab. 13), besonders markant jedoch bei Glutamin, Glutamat und Aspartat. Wurde der Stickstoff in Form von Nitrat zur Nährlösung gegeben, konnte keine Erhöhung der Aminosäuresynthese festgestellt werden. In diesem Fall lag die Markierung der Aminosäurefraktion sogar noch geringfügig unter der in N-freier Nährlösung.

Bei den mit Nitrat als N-Quelle angezogenen Diatomeen konnte allerdings unter ähnlichen Versuchsbedingungen nach Zugabe von 1 mM NaNO_3 ein gegenüber dem ^{14}C -Einbau in Nitrat-freier Nährlösung erhöhter Einbau des radioaktiven Kohlenstoffs in die Aminosäuren nachgewiesen werden. Hier betrug die ^{14}C -Markierung der Gesamtaminosäuren nach 10-minütiger Inkubation mit NO_3^- 58,5 gegenüber $23,2 \times 10^3$ dpm/ μg Chl. a in N-freier Nährlösung.

Tab. 13: Einfluß von NH_4^+ bzw. NO_3^- (1 mM) auf den ^{14}C -Einbau in die Aminosäuren der mit NH_4^+ angezogenen Diatomeen. Die Zugabe der N-Quelle sowie des $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ erfolgte nach 15-minütiger Belichtung der Diatomeen in N-freier Nährlösung. Der ^{14}C -Einbau wurde nach 10 Minuten bestimmt.
(Werte in dpm $\times 10^3/\mu\text{g}$ Chl. a)

Aminosäure	N-frei	N-frei + 1 mM NH_4^+	N-frei + 1 mM NO_3^-
Val	7,8	10,6	6,3
Ileu	2,4	3,0	1,7
Ala	56,6	67,0	52,3
Threo	1,6	2,7	3,2
Gly/Ser	20,3	28,1	16,6
Glu- NH_2	1,0	1,6	0,9
Asp- NH_2	2,1	2,7	1,4
Glu	19,7	29,7	16,8
Asp	40,7	62,5	41,2
	152,2	207,9	140,4

3.7.3. ^{15}N -AMMONIUM- BZW. ^{15}N -NITRAT-ASSIMILATION VON STICKSTOFF-MANGELKULTUREN

In Abb. 21 ist die Stickstoff-Aufnahme von NO_3^- bzw. NH_4^+ -adaptierten Diatomeen dargestellt, die einen Tag vor den Versuchen in N-freier Nährlösung inkubiert wurden. In allen drei Versuchen ergab sich eine ähnliche Tendenz der N-Aufnahme: nach einer schnellen ^{15}N -Aufnahme der Algen innerhalb von 30 Sekunden konnte bis zu 2 Minuten keine Erhöhung der ^{15}N -Anreicherung in der Diatomeentrockenmasse beobachtet werden. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten war

dann allerdings eine hohe ^{15}N -Aufnahmerate nachzuweisen.

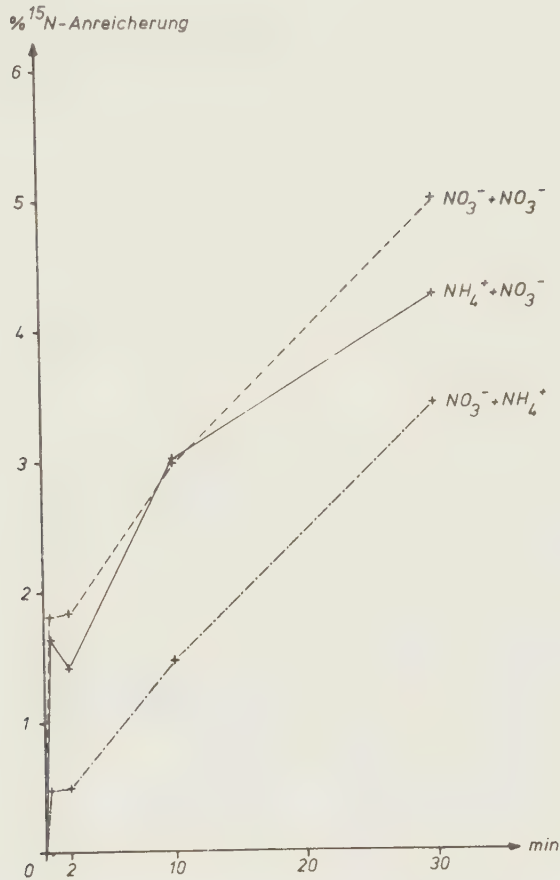


Abb. 21: Atom % ^{15}N -Anreicherung der Diatomeen nach Inkubation der NO_3^- -Mangelkultur mit $^{15}\text{NO}_3^-$ ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_3^-$) bzw. $^{15}\text{NH}_4^+$ ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$) und der NH_4^+ -Mangelkultur nach Inkubation mit $^{15}\text{NO}_3^-$ ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$)

Nur bei der NO_3^- -Mangelkultur, die mit $^{15}\text{NH}_4^+$ (1mM) inkubiert wurde, war schon nach 30 Sekunden eine ^{15}N -Markierung von Aminosäuren, d.h. Aspartat und Glutamat, festzustellen, wie die Abb. 22 zeigt. Nach 2 Minuten trat dann eine ^{15}N -Markierung in Glutamin und Glycin/Serin auf. Nach 10 Minuten Inkubationszeit war der Alanin-pool markiert, während Asparagin erst nach 30 Minuten eine geringe ^{15}N -Markierung aufwies.

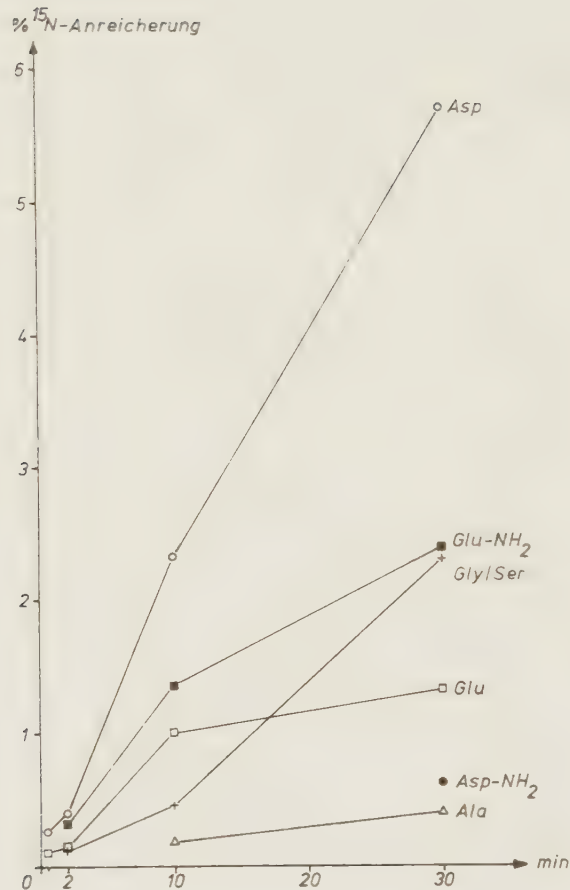


Abb. 22: Atom % ^{15}N -Anreicherung der Aminosäuren nach Inkubation der NO_3^- -Mangelkultur mit $^{15}\text{NH}_4^+$

Bemerkenswert war die hohe ^{15}N -Anreicherung des Aspartat-pools, die nach 30 Minuten deutlich über der Markierung der anderen Aminosäure-pools lag.

Bei Inkubation der NO_3^- -Mangelkultur mit ^{15}N -Nitrat (1 mM) war erst nach 10-minütiger Inkubationszeit eine ^{15}N -Markierung von Glutamin, Glutamat und Alanin festzustellen (s. Tab. 14). Der Glutamat-pool zeigte nach 30 Minuten den weitaus höchsten ^{15}N -Gehalt.

Tab. 14: ^{15}N -Markierung der Aminosäuren nach Inkubation der NO_3^- -Mangelkultur mit $^{15}\text{NO}_3^-$ (Atom % ^{15}N -Anreicherung)

Aminosäure	10 Min.	30 Min.
Asp- NH_2	-	-
Glu- NH_2	0,117	0,138
Asp	-	0,216
Gly/Ser	-	0,240
Glu	0,256	1,152
Ala	0,229	0,660

Bei Inkubation der NH_4 -Mangelkultur mit ^{15}N -Nitrat (1 mM) konnte zwar eine deutliche Aufnahme des markierten Stickstoffs wie bei den anderen Kulturen beobachtet werden (vgl. Abb. 21), es gelang jedoch innerhalb der 30-minütigen Versuchsdauer nicht, eine ^{15}N -Anreicherung einzelner Aminosäure-pools nachzuweisen.

4. DISKUSSION

4.1. PHOTOSYNTHETISCHE CO₂-FIXIERUNG DER MARINEN PLANKTISCHEN DIATOMEEN *Belleriochea yucatanensis*

Mit Hilfe von Kurzzeit-Fixierungsexperimenten sollte der Weg der photosynthetischen CO₂-Fixierung der marinen Diatomee *Belleriochea yucatanensis* ermittelt werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß *Belleriochea yucatanensis* unter "steady state"-Bedingungen der Photosynthese schon nach 5 Sekunden einen relativ großen Anteil des markierten Kohlenstoffs in Aminosäuren fixierte (39,2 %), was vor allem auf einen hohen ¹⁴C-Einbau in Aspartat zurückging (21,6 %; vgl. Tab. 6). Der prozentuale Anteil der Aminosäuren an der Gesamtfixierung lag sogar über dem Anteil der Phosphoglycerinsäure, der 29 % betrug.

Neben Aspartat waren auch Alanin, Glycin/Serin und Glutamat schon nach 5 Sekunden ¹⁴C-markiert.

Der prozentuale Anteil der Aminosäuren an der Gesamtfixierung erhöhte sich nach 10 Minuten Photosynthese auf 75,9 % (vgl. Tab. 6), so daß die Aminosäuren als Endprodukte der photosynthetischen CO₂-Fixierung anzusehen waren.

Die gewonnenen Ergebnisse unterstützen die Ergebnisse von HOLDSWORTH und COLBECK (1976), BEARDALL et al. (1976), GLOVER et al. (1975) und KREMER und BERKS (1978), die ebenfalls bei marinen Diatomeen einen überwiegenden Einbau des markierten Kohlenstoffs in Aminosäuren beschrieben. Ähnliche Befunde wurden von WILLENBRINK et al. (1975), KAREKAR und JOSHI (1973) und PATIL und JOSHI (1970) bei marinen Braun- und Grünalgen beschrieben. Dies läßt den Schluß zu, daß eine starke Aminosäuresynthese im Licht ein Charakteristikum für marine Algen sein könnte.

In dieser Hinsicht ergab sich ein Unterschied zu den Ergebnissen der klassischen Versuche von BASSHAM und CALVIN (1957) mit *Chlorella* und *Scenedesmus*. Diese Süßwasser-Algen fixierten den radioaktiven Kohlenstoff vor allem in Zuckern und Zuckerphosphaten, und nur zu einem geringen Teil in Aminosäuren.

Die frühe und prozentual hohe ^{14}C -Markierung von Aspartat deutet auf eine neben der RubP-Carboxylierung im Licht ablaufende β -Carboxylierung mit anschließender Transaminierung hin. PEP, das Substrat für eine β -Carboxylierung, ist ebenfalls schon nach einer Photosyntheseperiode von 5 Sekunden radioaktiv markiert (vgl. Tab. 6). Dies läßt den Schluß zu, daß zumindest ein Teil des PEP-pools auf PGS zurückgeht (s. Abb.23). Dies wird auch von HOLDSWORTH und COLBECK (1976) und APPLEBY et al. (1980) vermutet.

Der andere Teil des PEP-pools dürfte aus der Glykolyse stammen, von der ZELITCH (1973) annimmt, daß sie im Licht abläuft. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, daß PEP über die Pyruvat-Pi-Dikinase (E.C. 2.7.9.1) aus Pyruvat bereitgestellt wird, wie es bei C_4 -Pflanzen der Fall ist (vgl. COOMBS, 1979).

Eine Pyruvat-Pi-Dikinase-Aktivität wurde allerdings noch nicht bei marinen Diatomeen nachgewiesen (vgl. HOLDSWORTH und BRUCK, 1977). Bei der geringen Anzahl der bisher untersuchten species kann das Vorhandensein dieses Enzyms jedoch (noch) nicht generell ausgeschlossen werden.

Die Carboxylierung von PEP zur Bildung von Oxalacetat ist theoretisch mit Hilfe der folgenden drei Enzyme möglich: a) PEP-Carboxylase (E.C. 4.1.1.31), b) PEP-Carboxykinase (E.C. 4.1.1.49) und c) PEP-Carboxytransphosphorylase (E.C. 4.1.1.38). Das zuletzt genannte Enzym wurde jedoch bisher nur in Bakterien gefunden und scheidet nach den Ergebnissen von HOLDSWORTH und BRUCK (1977) für die

PEP-Carboxylierung in marinen Diatomeen aus.

Bei der in dieser Arbeit untersuchten *Bellerrochea yucatanensis* wird die neben der RubP-Carboxylierung ablaufende β -Carboxylierungsreaktion durch die PEP-Carboxykinase katalysiert, wie die unter 3.5.7. beschriebenen Ergebnisse beweisen. Eine PEP-Carboxylase-Aktivität konnte weder mit Hilfe eines optischen Enzymtests, noch mit radiochemischen Tests nachgewiesen werden (vgl. 2.4.1.)

Meine Ergebnisse unterstützen die Befunde von HOLDSWORTH und BRUCK (1977), KREMER und BERKS (1978) und APPLEBY et al. (1980), die ebenfalls in marinen (sowie Süßwasser-) Diatomeen eine PEP-Carboxylierung durch das Enzym PEP-Carboxykinase postulieren. Die zuletzt genannten Autoren fanden jedoch bei einer von ihnen untersuchten Diatomeenart (*Chaetoceros calcitrans*) eine PEP-Carboxylase und keine PEP-Carboxykinase. Dies deutet u. U. auf eine species-spezifische PEP-Carboxylierung bei marinen Diatomeen hin.

In krassem Widerspruch dazu stehen aber die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von MORRIS, die auch bei *Phaeodactylum tri-cornutum* - also der gleichen Diatomee, die auch von HOLDSWORTH und BRUCK und KREMER und BERKS untersucht wurde - eine PEP-Carboxylase-Aktivität fanden (vgl. auch Tab. 1).

Um diese widersprüchlichen Aussagen endgültig klären zu können, sind jedoch noch intensive Untersuchungen an marinen Diatomeen notwendig. Die meiner Ansicht nach gründlicheren Enzym-Charakterisierungen der Arbeitsgruppe von HOLDSWORTH sowie die eigenen Ergebnisse sprechen für die PEP-Carboxykinase als das β -carboxylierende Enzym in marinen Diatomeen.

Interessant ist die Beobachtung von KREMER und KÜPPERS (1977), die eine bemerkenswert hohe PEP-Carboxykinase-Aktivität

auch in Phaeophyceen fanden. Neben der hohen Aktivität dieses Enzyms existieren weitere Übereinstimmungen in Pigmentierung und Speicherstoffen zwischen den Bacillariophyceen und den Phaeophyceen (vgl. LEWIN, 1974). Dies eröffnet für eine chemisch-physiologische Verwandtschaft beider Algenklassen neue Aspekte.

Das Enzym PEP-Carboxykinase katalysiert also in marinen Diatomeen die folgende Reaktion:



Nach den Ergebnissen von HOLDSWORTH und BRUCK (1977) wird Bikarbonat als Carboxylierungssubstrat angenommen.

Wie die dargestellte Enzymreaktion zeigt, ist die Carboxylierungsreaktion mit einem Energiegewinn in Form von ATP verbunden. Dies dürfte für die Diatomeen energetisch einen großen ökologischen Vorteil darstellen.

Das entstehende Oxalacetat wird dann mit Hilfe der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase in Aspartat umgewandelt (vgl. Abb.23). Neben Aspartat taucht nach kurzen Fixierungszeiten kein ^{14}C -markiertes Malat auf (s. Tab. 6), so daß man hier annehmen muß, daß Malat erst sekundär im TCA-Zyklus gebildet wird. In dieser Hinsicht ähneln marine Algen den Aspartatbildnern der C_4 -Pflanzen (vgl. DOWNTON, 1971).

KAREKAR und JOSHI (1973) vermuteten, daß die Malatdehydrogenase durch NaCl gehemmt wird, so daß die Synthese von Malat blockiert sein könnte. Diese Autoren führten jedoch keine Enzymtests durch, die diese Annahme bestätigen konnten.

HOLDSWORTH und BRUCK (1977) dagegen konnten keine Hemmung der Malatdehydrogenase bei ihren Untersuchungen an der marinen Diatomee *Cylindrotheca closterium* durch NaCl feststellen, fanden jedoch auch neben Aspartat kein radioaktiv

markiertes Malat nach kurzen Fixierungszeiten. Daher muß vermutet werden, daß eher die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form von NADH zur Synthese von Malat der limitierende Faktor ist.

Die mit Hilfe der ^{14}C -"-tracer"-Technik gewonnenen Ergebnisse müssen allerdings kritisch betrachtet werden, da ein schneller Fluß des radioaktiven Kohlenstoffs durch einen kleinen Substanz-pool u. U. nicht erfaßt werden kann. Dies könnte bei Malat der Fall sein. So fanden BEARDALL et al. (1976) bei *Skeletonema costatum* nach 2 Sekunden 22,2 % des fixierten Kohlenstoffs in Malat. Bei *Bellerophcea yucatanensis* konnte jedoch erst nach 30 Sekunden ein geringer ^{14}C -Einbau in Malat beobachtet werden (0,6 %; vgl. Tab. 6).

Mit Hilfe der vorliegenden Ergebnisse kann nicht entschieden werden, welche Substanz als erste ^{14}C -markiert war, ob Asparat wie KAREKAR und JOSHI (1973) vermuteten, oder ob PGS wie KREMER und BERKS (1978) angaben. Da beide Carboxylierungsreaktionen jedoch weitgehend unabhängig voneinander arbeiten, ist dies kein grundlegendes Problem.

Wie bisher dargelegt wurde, sind im Licht zwei Carboxylierungssysteme in der Diatomeenzelle aktiv: a) die RubP-Carboxylase mit CO_2 als Substrat (AKAZAWA, 1979) und b) die PEP-Carboxykinase mit HCO_3^- als Substrat.

Es steht außer Frage, daß nur über eine RubP-Carboxylase eine Netto- CO_2 -Fixierung, d.h. eine Substanzproduktion möglich ist. Es stellt sich also die Frage nach der ökologischen Bedeutung der zusätzlichen PEP-Carboxylierung in marinen Diatomeen.

Da fast der gesamte anorganische Kohlenstoff im Meerwasser in Form von HCO_3^- vorliegt (vgl. BUCH, 1960), ist eine

Carboxylierungsreaktion, die Bikarbonat als Substrat verwendet (PEP-Carboxykinase), gegenüber einer Carboxylierungsreaktion mit CO_2 als Substrat (RubP-Carboxylase) begünstigt. Zieht man die Möglichkeit einer Decarboxylierung von Oxalacetat in Betracht, die neben CO_2 bei ATP-Überschuß PEP, bei ADP-Überschuß Pyruvat ergeben würde, so käme es in Zusammenarbeit mit der Carboanhydrase zu einer Anreicherung des CO_2 in der Zelle (vgl. Abb. 23). Von DÖHLER (1974, 1981) wird bei der Blaualge *Anacystis* auch die Möglichkeit einer Decarboxylierung von Aspartat diskutiert.

Eine Carboanhydrase-Aktivität wurde von GRAHAM und SMILLIE (1976) in marinen Algen nachgewiesen.

Da die Decarboxylierung von Oxalacetat ebenfalls durch die PEP-Carboxykinase katalysiert würde (HATCH und MAU, 1977), stellt sich allerdings die Frage nach der intrazellulären Regulation des carboxylierenden bzw. decarboxylierenden Schrittes.

Durch den Befund von HOLDSWORTH und BRUCK (1977), die ein "malic enzyme" in marinen Diatomeen nachwiesen, besteht theoretisch auch die Möglichkeit einer Decarboxylierung von Malat. Unter der Annahme eines kleinen Malat-pools würde die Decarboxylierung des entstehenden Malats die erst nach längeren Photosynthesezeiten auftretende ^{14}C -Markierung von Malat erklären.

Auf Grund der bisher vorliegenden Ergebnisse bei marinen Diatomeen kann allerdings nicht entschieden werden, welche Reaktion zur Anreicherung des CO_2 in der Zelle führt, und ob dies überhaupt eine physiologische Bedeutung für diese Algen hat. Da dem TCA-Zyklus für die Synthese von Aminosäuren in starkem Maße Kohlenstoff-Skelette entzogen werden, besitzt die PEP-Carboxylierung auf jeden Fall eine wichtige anaplerotische Funktion zur Auffüllung des TCA-Zyklus mit Oxalacetat.

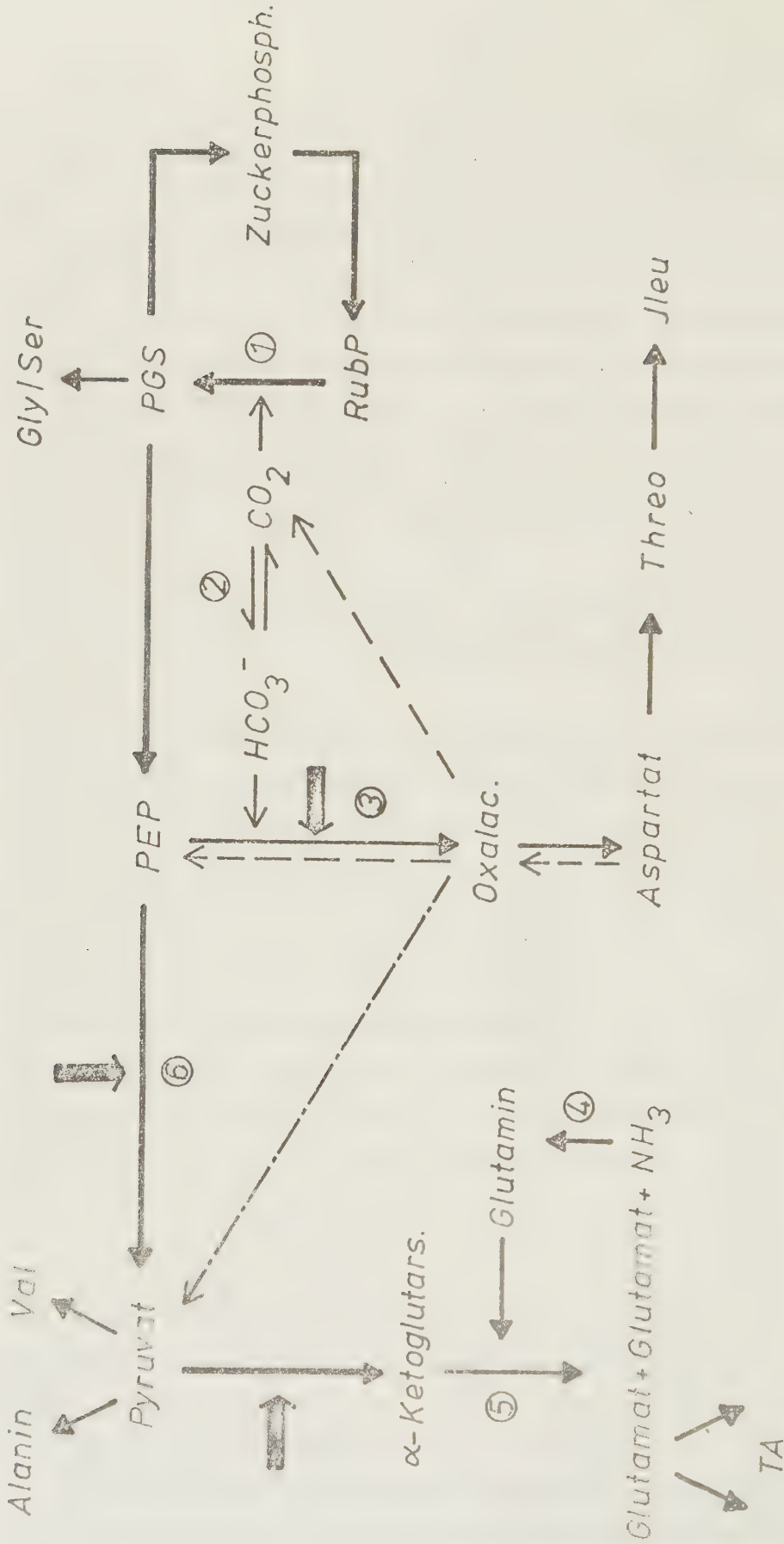


Abb. 23: Fixierungswege des anorganischen Kohlenstoffs und Stickstoff-Assimilation bei *Bellerochea yucatanensis* (schematisch; verändert nach BEARDALL et al., 1976, und APPLEBY et al., 1980). 1 = RubP-Carboxylase, 2 = Carboanhydrase, 3 = PEP-Carboxykinase, 4 = Glutamin-Synthetase, 5 = GOGAT, 6 = Pyruvat-Kinase, TA = Transaminierungen (Die Pfeile geben die durch NH₄⁺ stimulierten Reaktionen an.)

Wie schon erwähnt wurde, waren neben Aspartat auch Alanin, Glycin/Serin und Glutamat nach 5 Sekunden radioaktiv markiert. Im folgenden sollen die möglichen Biosynthesewege dieser Aminosäuren näher besprochen werden.

Abgesehen von Aspartat war der ^{14}C -Einbau in Alanin am größten (11,5 %; s. Tab. 6). Der prozentuale Anteil von Aspartat und Alanin zusammen betrug nach 10 Minuten 52,1 % der Gesamtfixierung. Alanin wird durch eine Aminierung von Pyruvat synthetisiert (s. Abb.23). Das C-Skelett des Pyruvats dürfte ebenfalls aus der PGS stammen und über PEP zur Alaninsynthese bereitgestellt werden (APPLEBY et al., 1980).

Glycin und Serin können im Laufe der Photorespiration gebildet werden (vgl. TOLBERT, 1979). Von PAUL und VOLCANI (1976) wurde als zentrales Produkt des Glykolat-Stoffwechsels bei der marinen Diatomee *Cylindrotheca fusiformis* Glycerat gefunden, was bei *Bellerophila yucatanensis* auch stärker ^{14}C -markiert auftrat als Glykolat (s. Tab. 6). Nach PAUL und VOLCANI konnte Glycerat auch unter Umgehung der Synthese von Glycin und Serin über Tartronsäuresemialdehyd synthetisiert werden. Glycerat kann nach Phosphorylierung wieder in den Calvin-Zyklus eingeschleust werden, so daß ein Teil der dem Zyklus entzogenen C-Skelette wieder diesem zugeführt werden kann.

Glutamat zeigte von den kurzzeitig markierten Aminosäuren den geringsten prozentualen Anteil an der Gesamtfixierung (1,8 %). Es wies jedoch innerhalb der 10 Minuten proportional die höchste Zuwachsrates auf (vgl. Tab. 6). Das C-Skelett von Glutamat stammt aus dem TCA-Zyklus (s. Abb.23). Zur Synthese von Glutamat und der Glutamat-Familie der Aminosäuren (Ornithin, Prolin, Arginin, Hydroxy-Prolin) werden dem TCA-Zyklus C-Skelette entzogen, worauf schon hingewiesen wurde (s.o.). Diese müssen dem TCA-Zyklus in Form

von Oxalacetat wieder zugeführt werden. Hier greift die anaplerotische Funktion der PEP-Carboxykinase-Reaktion ein. RAMBECK und BASSHAM (1973) wiesen darauf hin, daß der TCA-Zyklus im Licht zur Bereitstellung von C-Skeletten aktiv ist.

Die Fixierungsergebnisse bei *Bellerophoea yuatanensis* ergaben, daß ein großer Teil des assimilierten Kohlenstoffs in Aminosäuren fixiert wurde. Es wurde auch schon darauf hingewiesen, daß dies nicht nur für marine Diatomeen, sondern generell für marine Algen von mehreren Autoren beschrieben wurde (s.o.).

Die Überführung eines großen Teils des photoassimilierten Kohlenstoffs in Aminosäuren läßt den Schluß zu, daß die freien Aminosäuren einen Beitrag zur Osmoregulation der marinen Algen leisten. So wurde bei einer euryhyalinen marinen *Chlorella* species nach Inkubation in Meerwasser ein großer Teil des assimilierten Kohlenstoffs in Aminosäuren gefunden (HELLEBUST, 1965). Auch für *Cyclotella meneghiniana* und *Cyclotella cryptica* liegen ähnliche Ergebnisse vor (SCHOBERT, 1974; LIU und HELLEBUST, 1976). Hier war bei höheren Salinitäten des Nährmediums vor allem eine gesteigerte Prolin-Synthese festzustellen. Bei Anzucht der marinen Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* in erhöhten Salzgehalten reagierten die Algen ebenfalls mit einer gesteigerten Synthese von Aminosäuren, besonders von Prolin (BESNIER et al., 1969).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß neben dem K^+ - und Cl^- -Gehalt der Zellen auch freie Aminosäuren neben anderen Substanzen, wie z. B. Zuckern, von marinen Algen als osmoregulatorische Substanzen eingesetzt werden (vgl. HELLEBUST, 1976).

4.2. EINFLUSS DER STICKSTOFFQUELLE AUF DIE PHOTOSYNTHETISCHE CO₂-FIXIERUNG

Schon in der Einleitung wurde auf die enge Beziehung zwischen Photosynthese und N-Assimilation hingewiesen und auf die Konkurrenz beider Assimilationsprozesse um Reduktionsäquivalente.

Um ein Maß für die Größe der photosynthetischen CO₂-Fixierung in Abwesenheit einer NO₃⁻-Assimilation zu erhalten, wurden die Algen 15 Minuten in N-freier Nährlösung belichtet und dann die ¹⁴C-Gesamtfixierungsrate bestimmt. Dies bedeutet sicher eine Abkehr vom "steady state", jedoch kann angenommen werden, daß diese Zeitspanne nicht ausreicht, um einen schädigenden N-Mangel in den Zellen hervorzurufen.

Nach Zugabe des anorganischen Stickstoffs in Form von Nitrat konnte eine verminderte CO₂-Gesamtfixierungsrate beobachtet werden. Die Hemmung der Photosynthese betrug bei allen eingesetzten NaNO₃-Konzentrationen ca. 25 % (vgl. Abb.15). Die postulierte Konkurrenz um NADPH₂ bzw. um reduziertes Ferredoxin konnte also experimentell bewiesen werden.

THOMAS et al. (1976) und COLLOS und SLAWYK (1979) zeigten ebenso bei N-Mangelkulturen eine Hemmung der photosynthetischen CO₂-Fixierung nach Zugabe von Nitrat. Die beobachtete Hemmung dauerte bis 8 Stunden nach Nährstoffzugabe an (FALKOWSKI und STONE, 1975). Die Konkurrenz der Reduktionsschritte um Reduktionsäquivalente wurde von BONGERS (1958) auch bei Lichtsättigung der Photosynthese gefunden.

Das Ergebnis deutet aber auch darauf hin, daß die Konkurrenz zwischen Photosynthese und N-Assimilation einer gewissen Kontrolle unterliegt, so daß nur 25 % der in der Lichtreaktion der Photosynthese gebildeten Reduktionsäquivalente - auch

bei einem Nitrat-Überschuß - für die Reduktion des Nitrits zu Ammonium zur Verfügung gestellt werden.

Theoretisch wäre eine solche Kontrolle an zwei Stellen möglich: a) beim Eintritt des Nitrits in den Chloroplasten und b) durch die Ferredoxin: NADP-Oxidoreduktase (E.C. 1.6.99.4), wie von SPILLER et al. (1976) angenommen wurde.

Die Ergebnisse von FALKOWSKI (1975) deuten darauf hin, daß auch die Nitrat-Aufnahme bei marinen Diatomeen durch das Plasmalemma ein aktiver, ATP-verbrauchender Prozeß ist.

Wird der anorganische Stickstoff schon in seiner reduzierten Form als NH_4Cl den Diatomeen angeboten, stünden die Reduktionsäquivalente ganz der photosynthetischen CO_2 -Fixierung zur Verfügung, so daß sich eine gesteigerte ^{14}C -Gesamtfixierungsrate ergeben müßte. Diese Vermutung konnte experimentell belegt werden, da die mit Ammonium (1 mM) angezogenen Diatomeen eine ca. 20%ige Erhöhung der ^{14}C -Gesamtfixierungsrate gegenüber den mit Nitrat (1 mM) angezogenen Algen aufwiesen (s. Abb. 13). Da die Anzucht der Diatomeen mit einer NH_4Cl -Konzentration von 1 mM gelang, kann diese Konzentration für die Algen nicht als toxisch angesehen werden.

Die beobachtete erhöhte ^{14}C -Gesamtfixierungsrate der mit Ammonium angezogenen Diatomeen ergab sich durch einen erhöhten Einbau des markierten Kohlenstoffs in fast alle Photosyntheseprodukte (vgl. Tab. 8). Nur die Polysaccharidfraktion und Sedoheptulosebisphosphat zeigten keine erhöhte ^{14}C -Markierung. Dies war der Grund für den geringeren prozentualen Anteil der Polysaccharide und der Zuckerbisphosphate an der Gesamtfixierung. Demgegenüber war der Anteil der Zuckermonophosphate erhöht (s. Tab. 7).

Allgemein kann man feststellen, daß es bis auf die beschriebenen Ausnahmen zu einer ähnlichen Verteilung des markierten Kohlenstoffs auf die Photosyntheseprodukte für die mit Ammonium angezogenen Diatomeen kam. Die erhöhte Gesamtfixierungsrate müßte sich theoretisch auf eine erhöhte Aktivität der CO_2 -fixierenden Enzyme zurückführen lassen. Dies konnte jedoch nur für die PEP-Carboxykinase experimentell bestätigt werden (s. Tab.11). Die Aktivität der RubP-Carboxylase lag jedoch noch unter der Aktivität, die bei den mit Nitrat angezogenen Algen gemessen wurde. Da jedoch auch ein erhöhter ^{14}C -Einbau in PGS zu beobachten war, muß auch eine erhöhte RubP-Carboxylase-Aktivität *in vivo* postuliert werden. Die *in vitro* geringere Aktivität des Enzyms könnte durch eine Hemmwirkung von Zellinhaltsstoffen (Aminosäuren?) auf die RubP-Carboxylase erklärbar sein. Auch PAASCHE (1971) fand bei Anzucht von *Dunaliella* mit Ammonium eine gegenüber der Anzucht mit Nitrat erhöhte Aktivität der RubP-Carboxylase.

Die Ergebnisse von LAWRIE und WHEELER (1975) und HAMMEL et al. (1979) deuten auch auf eine Aktivierung der PEP-Carboxylase durch NH_4Cl hin.

Die durch die Ergebnisse belegte erhöhte ^{14}C -Gesamtfixierung war nicht mit einer erhöhten Wachstumsrate der mit Ammonium angezogenen Diatomeen korrelierbar (s. 3.1.), jedoch wurde schon darauf hingewiesen, daß dies eingehender untersucht werden müßte.

Allerdings fand CONOVER (1975) bei Anzucht von *Thalassiosira fluviatilis* mit $500\text{ }\mu\text{M}$ N - in Form von Nitrat, Ammonium und Harnstoff - keinen Einfluß der unterschiedlichen Stickstoffquellen auf die Wachstumsrate der Diatomeen.

Die erhöhte Aminosäuresynthese wirkte sich auch positiv auf den Gehalt an freien Aminosäuren der Diatomeenzellen

aus (vgl. Tab. 5). Vor allem die Amide Asparagin und Glutamin zeigten deutlich höhere pool-Größen als bei Anzucht der Diatomeen mit Nitrat. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch von LUI und ROELS (1972) bei der marinen Diatomee *Biddulphia aurita* beschrieben.

Während bei den mit Nitrat angezogenen Algen Asparagin als intrazelluläre N-Speichersubstanz anzusehen war, trat bei den mit Ammonium angezogenen Algen noch zusätzlich Glutamin als N-Speicher auf (vgl. z.B. VICKERY et al., 1936). Der Einsatz der Amide als N-Speicher ist für die Zelle energetisch günstig, da bei Asparagin - dem normalen N-Speicher - nur zwei C-Atome pro fixiertem N-Atom benötigt werden (s. LEA und FOWDEN, 1975). Liegt ein Überangebot von reduziertem anorganischem Stickstoff vor, der nicht in der Vakuole gespeichert werden kann, wird dieser Stickstoff dann zusätzlich in Form von Glutamin fixiert. Bei Glutamin beträgt das Verhältnis C:N 2,5.

Zumindest ein Teil der für die beobachtete gesteigerte Amid- und Aminosäuresynthese der mit Ammonium angezogenen Algen benötigten C-Skelette dürften den Synthesewegen der akzessorischen Pigmente entzogen werden (s. Tab. 4).

Liegen Ammonium und Nitrat in der Nährlösung vor, wird Ammonium-N bevorzugt von den Diatomeen aufgenommen. AMY und GARRETT (1974) und SOLOMONSON und SPEHAR (1977) führten das auf eine Inaktivierung der Nitrat-Reduktase durch Ammonium zurück, jedoch wurde von CRESSWELL und SYRETT (1979) auch eine Hemmung der Nitrat-Aufnahme diskutiert.

Direkt nach Zugabe des Ammoniums kam es kurzfristig zu einer Hemmung der photosynthetischen CO₂-Fixierung (s. Abb. 16). Diese Hemmung könnte auf einem Absinken des pH-Wertes im Stroma der Chloroplasten durch die eingedrungenen NH₄⁺-Ionen

beruhen (vgl. PURCZELD et al., 1978). Im weiteren Verlauf der Inkubation wurde dann eine gesteigerte ^{14}C -Gesamtfixierung beobachtet, die - wie meine Ergebnisse zeigen - auf eine erhöhte PEP-Carboxylierung zurückzuführen ist. Dadurch werden in verstärktem Maße C-Skelette bereitgestellt, die zur Entgiftung der NH_4^+ -Ionen in den Chloroplasten transportiert werden. Dort wird das Ammonium in Form von Aspartat fixiert und aus dem Chloroplasten gebracht. Die bemerkenswert hohe Aspartat-Synthese nach Zugabe von Ammonium spricht für die Annahme, daß Aspartat als Fixierungsprodukt der NH_4^+ -Ionen in Betracht kommt (s. Tab. 10).

Da das Substrat für die PEP-Carboxylierung - wie angenommen wurde - aus der PGS stammt, werden dem Calvin-Zyklus vermehrt C-Skelette entzogen, was zu einer verminderten pool-Größe der Calvin-Zyklus-Intermediate führt. Nach Adaptation der Diatomeen an Ammonium als N-Quelle kommt es jedoch auch zu einem erhöhten ^{14}C -Einbau in Intermediate des Calvin-Zyklus, so daß das Ungleichgewicht zwischen PEP-Carboxylierung und RubP-Carboxylierung wieder ausgeglichen wird. Die ähnliche prozentuale Verteilung des fixierten Kohlenstoffs auf die Photosyntheseprodukte der mit Nitrat bzw. Ammonium angezogenen Diatomeen spricht dafür (vgl. Tab. 6 und 7). Die unterschiedliche Aktivierungszeit der CO_2 -fixierenden Enzyme (PEP-Carboxykinase, RubP-Carboxylase) könnte auch die zu beobachtende Oszillation der photosynthetischen CO_2 -Fixierung nach Zugabe des NH_4Cl erklären (s. Abb. 16).

KANAZAWA et al. (1970), LAWRIE et al. (1976) und PLATT et al. (1977) führten den verstärkten Einbau des assimilierten Kohlenstoffs in Aminosäuren auf Kosten des Einbaus in Zucker und Zuckerphosphate vor allem auf eine Aktivitätserhöhung der Pyruvatkinase durch Ammonium zurück. In den Arbeiten sind jedoch keine Enzymdaten enthalten, die diese Annahmen belegen würden.

Demgegenüber konnten MOHAMED und GNANAM (1979) und GNANAM et al. (1980) weder eine Aktivitätserhöhung der Pyruvatkinase noch eine Steigerung der Aktivitäten der NAD-GAPDH, NADP-GAPDH und der Fructose-1,6-bisphosphatase durch 1 mM NH_4Cl feststellen. Diese Autoren beschrieben jedoch eine durch Ammonium gehemmte Lichtaktivierung bei den Enzymen Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) und FbPase. Diese Hemmung führte zu einer Akkumulation von PGS, das über Pyruvat in Aminosäuren umgewandelt wurde. Ein gehemmter PGS-Abbau konnte auch bei meinen Versuchen kurzfristig nachgewiesen werden (vgl. Kurvenverlauf der PGS in Abb.14 und Abb.17). Insofern zeigt NH_4Cl interessanterweise einen ähnlichen Effekt auf den photosynthetischen CO_2 -Stoffwechsel wie Blaulicht!

Zusammenfassend kann man sagen, daß Ammonium kurzfristig den Einbau des CO_2 in Oxalacetat stimulierte, was zu einem erhöhten C-Fluß in Richtung Aspartat und TCA-Zyklus auf Kosten der Zuckerphosphate und des C-Flusses in Alanin und Valin führte (vgl. Tab. 9 und 10).

Durch die erhöhtenpool-Größen der freien Aminosäuren der mit Ammonium angezogenen Diatomeen besteht hier nur noch begrenzt die Möglichkeit, das in die Zelle bzw. in den Chloroplasten eingedrungene NH_4^+ durch Überführung in organische Verbindungen (Aminosäuren) zu fixieren. Somit wird die Hemmung der photosynthetischen CO_2 -Fixierung bei höheren NH_4Cl -Konzentrationen (> 3 mM) verständlich (s. Abb.18). Die Hemmung wird durch die Entkopplung der Photophosphorylierung durch NH_3 im Chloroplasten verursacht (vgl. GOOD, 1977).

Der erhöhte Gehalt an freien Aminosäuren der mit Ammonium angezogenen Diatomeen war nicht mit einem erhöhten Proteingehalt der Zellen korrelierbar (s. 3.3.). Jedoch ist die Möglichkeit eines verstärkten Protein-turnover bzw. eines ver-

stärkten Flusses von Aminosäuren durch Protein (HUFFAKER und PETERSON, 1974) nicht auszuschließen.

4.3. EXKRETION VON PHOTOSYNTHESEPRODUKTEN

Während der ^{14}C -Fixierungsexperimente sollte parallel Größe und Art einer eventuell auftretenden Exkretion markierter Substanzen bestimmt werden.

Die Ergebnisse zeigten, daß erst nach 10 Minuten ^{14}C -markierte Substanzen in der Nährlösung nachweisbar waren. Es traten nur Aminosäuren, nämlich Alanin, Glycin/Serin, Glutamat und Aspartat auf (s. Abb.19). Polysaccharide und Glykolat wurden zwar auch von mehreren Autoren als Exkretionsprodukte nachgewiesen (s. Einleitung), konnten jedoch nicht als kurzzeitige Ausscheidungsprodukte beobachtet werden. Glykolat war aber auch als Zellinhaltsstoff nur schwach ^{14}C -markiert (s. Tab. 6 und 7).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von GÖCKE (1970) bei *Scenedesmus quadricauda* gab der prozentuale Anteil der ausgetrennten Aminosäuren an der Exkretion nicht bei allen Aminosäuren den prozentualen Anteil am Zellinhalt wieder (s. Abb. 19). Der Anteil von Aspartat war zugunsten des Anteils von Glycin/Serin vermindert.

Die Freisetzung von niedermolekularen Substanzen wie Glykolat und Aminosäuren durch intakte Algenzellen beruht vor allem auf einer Diffusion dieser Substanzen durch das Plasmalemma entlang des Konzentrationsgradienten und weniger auf einem aktiven, energieverbrauchenden Ausscheidungsvorgang, wie es der Begriff "Exkretion" impliziert. Nach den vorliegenden Ergebnissen handelt es sich hierbei allerdings um einen Substanz-spezifischen, selektiven Diffusionsvorgang durch das Plasmalemma.

Die Exkretionsrate für *Bellerrochea yucatanensis* betrug 1,5 % der Gesamtfixierung. Dieser Wert entsprach dem von IGNATIADES und FOGG (1973) für *Skeletonema costatum* in der exponentiellen Wachstumsphase angegebenen Wert von 2,1 - 4 %.

4.4. UNTERSUCHUNGEN ZUR STICKSTOFF-ASSIMILATION

In der Einleitung wurden die beiden diskutierten Möglichkeiten der biologischen Stickstoff-Assimilation eingehend erläutert. Mit Hilfe des ^{15}N -markierten Stickstoffs sollte untersucht werden, welcher N-Assimilationsweg bei der marinen Diatomee *Bellerrochea yucatanensis* abläuft.

Um einen möglichst schnellen Einbau des markierten Stickstoffs in die Aminosäuren nachweisen zu können, und um eine Isotopenverdünnung des markierten Stickstoffs weitgehend auszuschließen, mußten die Algen zur bevorzugten Aminosäure-Synthese angeregt werden. Dies geschah durch 15-minütige Belichtung der Diatomeen - mit Nitrat angezogen - in N-freier Nährlösung sowie durch Zugabe des ^{15}N -markierten Stickstoffs schon in der reduzierten Form als $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (s. 2.5.3.). Es wurde schon erwähnt, daß unter diesen Bedingungen von *Bellerrochea yucatanensis* bevorzugt Aminosäuren gebildet werden, und daß eine NH_4Cl -Konzentration von 1 mM nicht als toxisch für die Alge anzusehen ist (s.o.). Außerdem liegen keine Hinweise dafür vor, daß für exogen zugeführtes Ammonium bzw. für intrazellulär durch die Nitrat-Reduktion entstehendes Ammonium separate Assimilationsmechanismen angenommen werden können (vgl. z.B. YONEYAMA und KUMAZAWA, 1974, 1975 b, ATKINS und CANVIN, 1975; ITO und KUMAZAWA, 1978).

Wie meine Ergebnisse zeigen, war Glutamin schon nach 10 Sekunden ^{15}N -markiert, und es ist somit das primäre Fixierungsprodukt (s. Abb.20). Erst nach 1 Minute konnte eine

^{15}N -Markierung in Glutamat nachgewiesen werden. Diese Befunde sprechen dafür, daß der reduzierte Stickstoff primär durch die Glutamin-Synthetase in die Amidposition von Glutamin eingebaut wird und erst sekundär durch das GOGAT-Enzym Glutamat entsteht. Somit konnten die Vermutungen von FALKOWSKI und RIVKIN (1976) bei *Skeletonema costatum* bestätigt werden, daß marine Diatomeen den anorganischen Stickstoff über das GS/GOGAT-System assimilieren (vgl. Abb. 23).

Ebenso fanden TURPIN und HARRISON (1978) bei *Gymnodinium simplex* (Dinophyceae) und MCKENZIE et al. (1979) bei isolierten Chloroplasten von *Caulerpa simpliciuscula* Hinweise für die Assimilation des anorganischen Stickstoffs über das GS/GOGAT-System.

Der Weg der Stickstoff-Assimilation verläuft also bei marinen Algen ebenso wie für *Chlorella* von BAKER und THOMPSON (1961), für Blaualgen von MEEKS et al. (1977) und von STEWART und ROWELL (1975), sowie für Höhere Pflanzen von LEWIS und PATE (1973) und von LEWIS und BERRY (1975) beschrieben, über das gleiche Enzymsystem mit Glutamin als primärem Fixierungsprodukt.

Demgegenüber fanden BASSHAM und KIRK (1964) bei *Chlorella* als erstes ^{15}N -markiertes Produkt Glutamat, was also für eine N-Assimilation über die Glutamat-Dehydrogenase sprach. Allerdings ist die von diesen Autoren gewählte Fixierungszeit von 5 Minuten sicher nicht aussagekräftig, um tatsächlich das primäre ^{15}N -Fixierungsprodukt zu ermitteln. Von BASSHAM und KIRK wurde auch selbst darauf hingewiesen, daß bei ihren Experimenten die Möglichkeit eines primären ^{15}N -Einbaus in Glutamin nicht auszuschließen gewesen sei.

Wie auch meine Ergebnisse zeigen, kommt der Glutamat-Dehydrogenase unter physiologischen Bedingungen auf Grund des hohen K_m -Wertes für NH_4^+ keine Bedeutung als N-Assimilationsenzym zu. So wurde z. B. bei *Skeletonema costatum* ein K_m -Wert für NH_4^+ für die Glutamin-Synthetase von $29 \mu\text{M}$, für die Glutamat-Dehydrogenase dagegen von 28 mM gefunden (FALKOWSKI und RIVKIN, 1976). Nur bei unphysiologisch hohen intrazellulären NH_4^+ -Konzentrationen kann das Enzym zur Entgiftung beitragen (s. GIVAN, 1979).

Aus dem Gesagten geht hervor, daß die Wahl der eingesetzten NH_4Cl -Konzentration sorgfältig geprüft werden muß, um nicht unphysiologische Effekte zu erhalten!

GAYLER und MORGAN (1976) fanden für die Glutamat-Dehydrogenase von *Caulerpa simpliciuscula* einen K_m -Wert für NH_4^+ von $0,4 - 0,7 \text{ mM}$. Auch die Ergebnisse von LEWIS und PROBYN (1978) schließen die Möglichkeit nicht aus, daß u. U. beide Enzyme in der Pflanzenzelle aktiv sein könnten. Dies ist aber durch meine Ergebnisse nicht zu bestätigen.

Von MIFLIN und LEA (1976) wurde die Möglichkeit einer reduktiven Aminierung von Pyruvat zu Alanin sowie von Oxalacetat zu Aspartat diskutiert. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann aber in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von KIRK und LEECH (1972) angenommen werden, daß Alanin und Aspartat zumindest zum überwiegenden Teil aus der Transaminierungsreaktion von Glutamat mit Pyruvat bzw. Oxalacetat gebildet werden.

Während Glutamin sowohl als primäres Fixierungsprodukt als auch als intrazellulärer Stickstoff-Speicher dienen kann, scheint Asparagin ausschließlich als Speichersubstanz in Betracht zu kommen (s. Tab. 5). Dies bestätigt die Ergebnisse von BAUER et al. (1977). Der Syntheseweg von Asparagin verläuft über die Glutamin-abhängige Asparagin-Synthetase (vgl. MIFLIN und LEA, 1977).

Der relativ hohe ^{15}N -Einbau in Aspartat wird durch die vermehrte Bereitstellung von Oxalacetat durch die durch NH_4^+ gesteigerte PEP-Carboxykinase-Aktivität, die zu einer verstärkten Aspartatsynthese führt, verständlich (s. Abb. 23 und Tab. 12).

Der parallel untersuchte ^{14}C -Einbau in die Aminosäuren ergab für Glutamat schon nach 5 Sekunden eine radioaktive Markierung, während es erst nach 1 Minute eine ^{15}N -Markierung aufwies (s. Tab.12). Ein umgekehrtes Ergebnis ergab sich für Glutamin: hier konnte schon nach 10 Sekunden eine ^{15}N -Markierung, jedoch erst nach 2 Minuten eine ^{14}C -Markierung nachgewiesen werden. Unter der Voraussetzung, daß das GS/GOGAT-System nur im Chloroplasten aktiv ist (WALLSGROVE et al., 1979), soll im folgendem versucht werden, dieses Ergebnis zu erklären: KIRK und LEECH (1972) fanden in isolierten Chloroplasten zwar einen großen Glutamat-pool, jedoch nur Spuren eines ^{14}C -Einbaus in Glutamat. Also muß man annehmen, daß das C-Skelett des Glutamats außerhalb des Chloroplasten (im Mitochondrium ?) synthetisiert wird. Auch *Bellerochea yucatanensis* wies einen großen Glutamat-, aber nur einen kleinen Glutamin-pool auf (s. Tab. 5). Nach dem Einströmen der Ammonium-Ionen in den Chloroplasten werden diese durch die Glutamin-Synthetase in Glutamin, also in eine organische Verbindung überführt; es resultiert der beobachtete starke Anstieg des Glutamin-pools in der Zelle (s. Tab. 5).

Durch den vorhandenen großen Glutamat-pool ist die Regeneration des Akzeptors für die Glutamin-Synthetase-Reaktion durch das GOGAT-Enzym nicht von großer Bedeutung. Außerdem kommt es durch das ^{14}N -Glutamat zu einer Isotopenverdünnung der markierten Aminosäure, so daß eventuell entstehendes ^{15}N -Glutamat nicht aufgefunden werden kann. Im Laufe der Zeit käme es so zu einer Erschöpfung des Glutamats im Chloroplasten, die aber durch das Einströmen ^{14}C -markierter

C-Skelette bzw. durch die GOGAT-Reaktion verhindert wird. Auf diese Weise kann dann auch ^{14}C -markiertes Glutamin bzw. ^{15}N -markiertes Glutamat gefunden werden.

Von ^{15}N -Glutamat wird dann die Aminogruppe zur Synthese der anderen Aminosäuren (Glycin/Serin, Alanin, Aspartat) bereitgestellt (s. Tab. 12).

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigten unter anderem, daß *Belleriochea yucatanensis* Ammonium-N gegenüber Nitrat-N bevorzugt aufnimmt. Dies unterstützt die Ergebnisse von LUI und ROELS (1972), die bei der marinen Diatomee *Biddulphia aurita* eine 2,3 - 2,4fach schnellere Aufnahme von Ammonium gegenüber Nitrat fanden. Es stellte sich die Frage, ob die mit Ammonium angezogenen Diatomeen Nitrat aufnehmen bzw. assimilieren konnten. Zur Klärung dieser Frage wurden die mit Ammonium angezogenen Algen 15 Minuten in N-freier Nährlösung belichtet, um die Konkurrenz zwischen NH_4 und NO_3 in der Nährlösung auszuschalten. 10 Minuten nach Zugabe der Stickstoffquelle und des Bikarbonats konnte kein gegenüber der Kontrolle erhöhter ^{14}C -Einbau in die Aminosäuren beobachtet werden (s. Tab. 13). Bei den mit Nitrat angezogenen Diatomeen war unter identischen Versuchsbedingungen ein gegenüber der Kontrolle erhöhter ^{14}C -Einbau in die Aminosäuren festzustellen (s. 3.7.2.).

Das Ergebnis kann unter zwei Gesichtspunkten erklärt werden: a) durch das Fehlen des Nitrat-Aufnahmesystems bei den mit Ammonium angezogenen Diatomeen wie von CRESSWELL und SYRETT (1979) bei *Phaeodactylum tricornutum* vermutet wurde, oder b) bei vorhandener Nitrat-Aufnahme durch die Algen durch das Fehlen der Nitrat- und Nitrit-Reduktase wie von LUI und ROELS (1972) angegeben wurde.

Die Ergebnisse der Gesamt- ^{15}N -Aufnahme der mit Ammonium angezogenen Algen deuten aber darauf hin, daß bei Anzucht mit Ammonium die Diatomeen die Fähigkeit zur NO_3^- -Aufnahme besitzen, jedoch das aufgenommene Nitrat nicht direkt assimilieren können. Ähnliche Ergebnisse liegen für *Skeletonema costatum* von DEMANCHE et al. (1979) vor. Nach Umsetzen von in NH_4^+ -Nährlösung gewachsenen *Skeletonema costatum* in nitrat-haltige Nährlösung konnten SERRA et al. (1978) jedoch eine schnelle Induktion der NADH-Nitrat-Reduktase erreichen.

Die beobachtete Aufnahme von Nitrat in Abwesenheit einer aktiven Nitrat-Reduktase beweist die Aussagen von HEIMER und FILNER (1971), SCHLOEMER und GARRETT (1974) und RAO und RAINS (1976) auch für marine Diatomeen, daß die NO_3^- -Aufnahme unabhängig von einer aktiven Nitrat-Reduktase ist. Die Behauptung von BUTZ und JACKSON (1977), daß NO_3^- -Aufnahme und -Reduktion durch das gleiche Enzym katalysiert würden, konnte also nicht bestätigt werden.

Auch nach 24-stündiger Inkubation der Diatomeen in NO_3^- -freier Nährlösung war offensichtlich eine Nitrat- und Nitrit-Reduktase-Aktivität vorhanden, da ein ^{15}N -Einbau in Aminosäuren nachzuweisen war (vgl. Tab. 14). Die höhere ^{15}N -Anreicherung von Glutamat (0,256 %) und Alanin (0,229 %) nach 10 Minuten gegenüber 0,117 % von Glutamin dürfte wohl eher auf einen schnellen Fluß des markierten Stickstoffs durch den Glutamin-pool hindeuten, als eine Abweichung vom GS/GOGAT-System anzeigen.

Bei Inkubation der NO_3^- -Mangelkultur mit Ammonium war ein schneller ^{15}N -Einbau in die Aminosäuren zu erwarten (s. Abb. 22). Durch die schon beschriebene Stimulation der PEP-Carboxykinase durch Ammonium und der daraus resultierenden verstärkten Synthese von Oxalacetat wird die hohe ^{15}N -Anreicherung des Aspartat-pools verständlich.

Die geschilderten Ergebnisse deuten darauf hin, daß das GS/GOGAT-System auch in N-Mangelkulturen vorhanden ist bzw. schnell aktiviert werden kann.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Mit Hilfe von ^{14}C -Kurzzeitfixierungsexperimenten wurde der Weg der photosynthetischen CO_2 -Fixierung bei Reinkulturen der marinen planktischen Diatomee *Bellerochea yucatanensis* v. STOSCH untersucht. Unter "steady state"-Bedingungen wurde schon nach 5 Sekunden ein relativ großer prozentualer Anteil des fixierten Kohlenstoffs in Aminosäuren, vor allem Aspartat, gefunden. Dies wurde auf eine neben der RubP-Carboxylierung im Licht ablaufende PEP-Carboxylierung zurückgeführt. Als PEP-carboxylierendes Enzym wurde die PEP-Carboxykinase (E.C. 4.1.1.49) nachgewiesen. Eine PEP-Carboxylase-Aktivität konnte in *Bellerochea yucatanensis* nicht gefunden werden.

Schon nach 10 Minuten konnten ausgeschiedene ^{14}C -markierte Aminosäuren (Alanin, Glutamat, Glycin/Serin und Aspartat) in der Nährlösung nachgewiesen werden. Es wurde die Möglichkeit eines Substanz-spezifischen, selektiven Diffusionsvorganges durch das Plasmalemma diskutiert.

Die photosynthetische CO_2 -Fixierung wurde durch Nitrat gehemmt. Dies wurde auf die Konkurrenz um Reduktionsäquivalente zwischen der Dunkelreaktion der Photosynthese und der Nitrit-Reduktion im Chloroplasten zurückgeführt.

Waren Nitrat und Ammonium in der Nährlösung vorhanden, so nahm *Bellerochea yucatanensis* bevorzugt Ammonium auf. Nach Zugabe des Ammoniums kam es kurzfristig zu einer deutlich höheren Aminosäuresynthese, besonders von Aspartat. Dies wurde mit einer gesteigerten PEP-Carboxylierung durch die PEP-Carboxykinase erklärt. Die Entgiftungsfunktion der PEP-Carboxylierung wurde diskutiert. Bei Anzucht der Diatomeen mit 1 mM Ammonium wurde eine gegenüber der Anzucht mit Nitrat als N-Quelle erhöhte ^{14}C -Gesamtfixierungsrate nachgewie-

sen. Dies beruhte auf einem erhöhten ^{14}C -Einbau in fast alle Photosyntheseprodukte. Allerdings wurde ein prozentual geringerer Einbau des Kohlenstoffs in die Zuckerbisphosphate und in die Polysaccharidfraktion beobachtet. Bei Anzucht der Diatomeen mit Ammonium war die Aktivität der PEP-Carboxykinase erhöht.

Bellerochea yucatanensis zeigte bei Anzucht mit Ammonium als N-Quelle einen erhöhten Gehalt an freien Aminosäuren, besonders der Amide Glutamin und Asparagin. Dagegen war der Gehalt an akzessorischen Pigmenten (β -Carotin, Chlorophyll c) vermindert.

Mit Hilfe von Kurzzeitfixierungsexperimenten mit ^{15}N -markiertem Ammonium wurde der Weg der N-Assimilation bei *Bellerochea yucatanensis* untersucht. Schon nach 10 Sekunden konnte ^{15}N -markiertes Glutamin als das primäre Fixierungsprodukt nachgewiesen werden.

Auf Grund der erzielten Ergebnisse wird der Schluß gezogen, daß die Assimilation des anorganischen Stickstoffs über das GS/GOGAT-System abläuft. Auch wird auf Grund der Versuchsdaten angenommen, daß die Nitrat-Reduktase und das Nitrat-Aufnahme-System bei *Bellerochea yucatanensis* nicht identisch sind.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- AKAZAWA, T.: Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase.
In M. Gibbs und E. Latzko (eds.) Photosynthesis II, S.208-229
Encycl. Plant Physiol. New Series, Vol. 6, Springer-Verlag,
Berlin-Heidelberg-New York 1979
- ALEEM, A.A.: Potential bioassay of natural seawaters and
influence of certain trace elements on the growth of phyto-
plankton organisms. Helgoländer wiss. Meeresunters. 20,
229-248 (1970)
- ALLEN, E.J. und E.W. NELSON: On the artificial culture of
marine plankton organisms. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 8,
421-474 (1910).
- AMY, N.K. und R.H. GARRETT: Purification and characterization
of the nitrate reductase from the diatom *Thalassiosira pseu-*
donana. Plant Physiol. 54, 629-637 (1974)
- ANDERSON L.E. und R.C. FULLER: Photosynthesis in *Rhodospiril-*
lum rubrum. IV. Isolation and characterization of ribulose-
1,5-diphosphate carboxylase. J. Biol. Chem. 244, 3105-3109
(1969)
- ANTIA, N.J., B.R. BERLAND, D.J. BONIN und S.Y. MAESTRINI:
Comparative evaluation of certain organic and inorganic sour-
ces of nitrogen for phototrophic growth of marine microalgae.
J. mar. biol. Ass. U.K., 55, 519-539 (1975)
- ANTIA, N.J., C.D. McALLISTER, T.R. PARSONS, K. STEPHENS und
J.D.H. STRICKLAND: Further measurements of primary production
using a large-volume plastic sphere. Limnol. Oceanogr. 166-183
(1963)
- APPLEBY, G., J. COLBECK, E.S. HOLDSWORTH und H. WADMAN:
 β -Carboxylation enzymes in marine phytoplankton and isolation
and purification of pyruvate carboxylase from *Amphidinium*
carterae (Dinophyceae). J. Phycol. 16, 290-295 (1980)
- ATKINS, C.A. und D. T. CANVIN: Nitrate, nitrite and ammonia
assimilation by leaves: effect of inhibitors. Planta 123,
41-51 (1975)
- BAKER, J.E. und J.F. THOMPSON: Assimilation of ammonia by
nitrogenstarved cells of *Chorella vulgaris*. Plant Physiol. 36,
208-212 (1961)
- BASSHAM, J.A. und M. CALVIN: The path of carbon in photo-
synthesis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 1957

- BASSHAM, J.A. und M. KIRK: Photosynthesis of amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* 90, 553-562 (1964)
- BAUER, A., A.A. URQHART und J.W. JOY: Amino acid metabolism of pea leaves. Labeling studies on utilization of amides. *Plant Physiol.* 59, 920-924 (1977)
- BEARDALL, J., D. MUKERJI, H.E. GLOVER und J. MORRIS: The path of carbon in photosynthesis by marine phytoplankton. *J. Phycol.* 12, 409-417 (1976)
- BESNIER, V., M. BAZIN, J. MARCHELIDON und M. GENEVET: Étude de la variation du pool intracellulaire des acides amines libres d'une diatomée marine en fonction de la salinité. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 51, 1255-1262 (1969)
- BIELESKI, R.L. und N.A. TURNER: Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin layer elektrophoresis and chromatography. *Analyt. Biochem.* 17, 278-293 (1966)
- BONGERS, L.H.J.: Kinetic aspects of nitrate reduction. *Neth. J. Agr. Sci.* 6, 70-88 (1958)
- BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
- BROCKMANN, U.H., K. EBERLEIN, P. HOSUMBEEK, H. TRAGESER, E. MAIER-REIMER, H.K. SCHÖNE und H.D. JUNGE: The Development of a natural plankton population in an outdoor tank with nutrient-poor sea water. I. Phytoplankton succession. *Mar. Biol.* 43, 1-17 (1977)
- BUCH, K.: Kohlendioxid im Meerwasser. *Encycl. Plant Physiol.* 5 (1), 46-61 (1960)
- BUSH, E.T.: General applicability of the channels ratio method of measuring liquid scintillation counting efficiencies. *Anal. Chem.* 35, 1024-1029 (1963)
- BUTZ, R.G. und W.A. JACKSON: A mechanism for nitrate transport and reduction. *Phytochemistry* 16, 409-417 (1977)
- CHAPMAN, G. und A.G. RAE: Excretion of photosynthate by a benthic diatom. *Mar. Biol.* 3, 341-351 (1969)
- CLARK, M.E., G.A. JACKSON und W.J. NORTH: Dissolved free amino acids in southern California coastal waters. *Limnol. Oceanogr.* 17, 749-758 (1972)
- COLLOS, Y. und G. SLAWYK: ^{13}C and ^{15}N uptake by marine phytoplankton. I. Influence of nitrogen source and concentration in laboratory cultures of diatoms. *J. Phycol.* 15, 186-190 (1979)

- CONOVER, S.A.M.: Partitioning of nitrogen and carbon in cultures of the marine diatom *Thalassiosira fluviatilis* supplied with nitrate, ammonium or urea. *Mar. Biol.* 32, 231-246 (1975)
- COOK, G.B., J.A. GOLEB und V. MIDDELBOE: Optical Nitrogen-15 analysis of small nitrogen samples using a noble gas to sustain the discharge. *Nature* 216, 475-476 (1967)
- COOMBS, J.: Enzymes of C₄ Metabolism. In M. Gibbs und E. Latzko (eds.) *Photosynthesis II*. S. 251-262. *Encycl. Plant Physiol. New Series*, Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1979
- CRESSWELL, R.C. und P.J. SYRETT: Ammonium inhibition of nitrate uptake by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Pl. Sci. Lett.* 14, 321-325 (1979)
- CROSBY, L.H. und E.J.F. WOOD: Studies on Australian and New Zealand Diatoms. I. Planktonic and allied species. *Trans. roy. Soc. New Zealand* 85, 483-530 (1958)
- DE MANCHE J.M., H.C. CURL, D.W. LUNDY und P.L. DONAGHAY: The rapid response of the marine diatom *Skeletonema costatum* to changes in external and internal nutrient concentration. *Mar. Biol.* 53, 323-333 (1979)
- DÖHLER, G.: C₄-Weg der Photosynthese in der Blaualge *Anacystis nidulans*. *Planta* 118, 259-269 (1974)
- DÖHLER, G.: Einfluß der Kulturbedingungen auf die photosynthetischen Carboxylierungsreaktionen von *Chlorella vulgaris*. *Zeitschr. Pflanzenphysiol.* 71, 144-153 (1974)
- DÖHLER, G.: CO₂-Fixierung während der Photosynthese-Induktion von *Synechococcus*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 176, 261-273 (1981)
- DOWNTON, W.J.S.: Further evidence for two modes of carboxyl transfer in plants with C₄-photosynthesis. *Can. J. Bot.* 49, 1439-1442 (1971)
- EPPLEY, R.W.: The Growth and culture of diatoms. In D. Werner (ed.), *The biology of diatoms. Botanical Monographs* Vol. 13, S. 24-65 Blackwell Scientific Publications, Oxford 1977
- EPPLEY, R.W., E.H. RENGEL, W.G. HARRISON und J.J. CULLEN: Ammonium distribution in southern California coastal waters and its role in the growth of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 24, 495-509 (1979)
- EPPLEY, R.W., J.N. ROGERS und J.J. MC CARTHY: Half saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 14, 912-920 (1969)

- FALKOWSKI, P.G.: Nitrate uptake in marine phytoplankton: Comparison of half-saturation constants from seven species. *Limnol. Oceanogr.* 20, 412-417 (1975)
- FALKOWSKI, P.G. und R.B. RIVKIN: The role of glutamin synthetase in the incorporation of ammonium in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 12, 448-450 (1976)
- FALKOWSKI, P.G. und D.P. STONE: Nitrate uptake in marine phytoplankton: energy sources and the interaction with carbon fixation. *Mar. Biol.* 32, 77-84 (1975)
- FAUST, H.: Zur Probenchemie von Stickstoffverbindungen für die emissionsspektrometrische Isotopenanalyse des Stickstoffs. *Isotopenpraxis* 1, 62-65 (1965)
- FAUST, H.: Probenchemie ^{15}N -markierter Stickstoffverbindungen im Mikro- bis Nanomolbereich für die emissionsspektrometrische Isotopenanalyse. *Isotopenpraxis* 3, 100-103 (1967)
- FEIGE, B., HGIMMLER, W.D. JESCHKE und W. SIMONIS: Eine $\text{Me-}^{14}\text{C}$ - und ^{32}P -markierten Stoffwechselprodukten. *J. Chromatogr.* 41, 80-90 (1969)
- FIEDLER, R. und G. PROKSCH: Emission spektrometry for routine analysis of nitrogen-15 in agriculture. *Plant and Soil* 36, 371-378 (1972)
- FLEISCHMANN, K.: Anreicherung von ^{15}N nach dem Trennrohrverfahren von Clusius und Dickel. *Phys. Z.* 41, 14-18 (1940)
- GAYLER, K.R. und V.R. MORGAN: An NADP-dependent glutamate dehydrogenase in chloroplasts from the marine green alga *Caulerpa simpliciuscula*. *Plant Physiol.* 58, 283-287 (1976)
- GIVAN, C.V.: Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry* 18, 375-382 (1979)
- GLOVER, H., J. BEARDALL und I. MORRIS: Effects of environmental factors on photosynthesis patterns in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). Effect of nitrogen deficiency and light intensity. *J. Phycol.* 11, 424-429 (1975)
- GLOVER, H. und J. MORRIS: Photosynthetic carboxylating enzymes in marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 24, 510-520 (1979)
- GOOD, N.E.: Uncoupling of electron transport from photophosphorylation in chloroplasts. In A. Trebst und M. Avron (eds.) *Photosynthesis I*. S. 429-437 (1977). *Encycl. Plant Physiol.* New Series, Vol. 5, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- GNANAM, A., A.H. MOHAMED und R. SEETHA: Comparative studies on the effect of ammonia and blue light on the regulation of photosynthetic carbon metabolism in higher plants. In H. Senger (ed.) *The blue light syndrome*. S. 435-443, Springer-Verlag, Berlin 1980
- GOCKE, K.: Untersuchungen über Abgabe und Aufnahme von Aminosäuren und Polypeptiden durch Planktonorganismen. *Arch. Hydrobiol.* 67, 285-367 (1970)

GOERING, J.J., D.D. WALLEN und R.M. NAUMAN: Nitrogen uptake by phytoplankton in the discontinuity layer of the eastern subtropical Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 15, 789-796 (1970)

GOLEB, J.A. und V. MIDDELBOE: Optical nitrogen-15 analysis of small nitrogen samples with a mixture of helium and xenon to sustain the discharge in an electrodeless tube. *Anal. Chim. Acta* 43, 229-234 (1968)

GOLLEY, F.B.: Energy flux in ecosystems. In J.A. Wiens (ed.) *Ecosystem structure and function*. S. 69-88, Oregon State University Press, Corvallis 1972

GRAHAM, D. und R.M. SMILLIE: Carbonate Dehydratase in marine organisms of the Great Barrier Reef. *Aus. J. Plant Physiol.* 3, 113-119 (1976)

GUILLARD, R.R.L. und J.H. RYTHÉ: Studies of marine planktonic diatoms. *Cyclotella nana*, *Detonula confervacea*. *Can. J. Microbiol.* 8, 229-239 (1962)

GUIRAUD, G. und L.A. BUSCARLET: Comparaison entre spectrométrie de masse et spectrométrie d'émission pour les analyses isotopiques d'azote. *Int. J. appl. Radiat. Isotopes* 26, 187-193 (1975)

GUTIERREZ, M., R. KANAI, S.C. HUBER, S.B. KU und G.E. EDWARDS: Photosynthesis in mesophyll protoplasts and bundle sheath cells of various types of C₄ plants. I. Carboxylase and CO₂ fixation studies. *Z. Pflanzenphysiol.* 72, 305-319 (1974)

HAMMEL, K.E., K.L. CORNWELL und J.A. BASSHAM: Stimulation of dark CO₂ fixation by ammonia in isolated mesophyll cells of *Papaver somniferum* L. *Plant Cell Physiol.* 20, 1523-1529 (1979)

HATCH, M.D.: An assay for PEP-Carboxykinase in crude tissue extracts. *Anal. Biochem.* 52, 280-285 (1973)

HATCH, M.D. und S. MAU: Properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase operative in C₄ pathway photosynthesis. *Aust. J. Plant Physiol.* 4, 207-216 (1977)

HEALY, F.P., J. COOMBS und B.E. VOLCANI: Changes in pigment content of the diatom *Navicula pelliculosa* (Bréb.) Hilse in silicon-starvation synchrony. *Arch. Mikrobiol.* 59, 131-142 (1967)

HEILMANN, J., J. BARROLLIER und E. WATZKE: Beitrag zur Aminosäurebestimmung auf Papierchromatogrammen. *Hoppe-Seilers Z. physiol. Chemie* 309, 219-220 (1957)

HEIMER, Y.M. und P. FILNER: Regulation of the nitrate assimilatory pathway in cultured Tobacco cells. II. The nitrate uptake system. *Biochim. Biophys. Acta* 230, 362-372 (1971)

- HELLEBUST, J.A.: Exkretion of some organic Compounds by marine Phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 10, 192-206 (1965)
- HELLEBUST, J.A.: Osmoregulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27, 485-505 (1976)
- HERBERG, R.L.: Channels ratio method of quench correction in liquid scintillation counting. Packard, Technical Bulletin 15, 1-8 (1965)
- HEWITT, E.J.: Assimilatory nitrate-nitrite reduction. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26, 73-100 (1975)
- HOCH, M. und H. WEISSER: Eine spektroskopische Mikromethode zur Bestimmung von ^{15}N . *Helvetica Chim. Acta* 33, 2128-2134 (1950)
- HOLDSWORTH, E.S. und K. BRUCK: Enzymes concerned with β -carboxylation in marine phytoplankter. *Arch. Biochem. Biophys.* 182, 87-94 (1977)
- HOLDSWORTH, E.S. und J. COLBECK: The pattern of carbon fixation in the marine unicellular alga *Phaeodactylum tri-cornutum*. *Mar. Biol.* 38, 189-199 (1976)
- HOLM-HANSEN, O., K. NISHIDA, V. MOSES und M. CALVIN: Effects of mineral salts on short-term incorporation of carbon dioxide in *Chlorella*. *J. Exp. Bot.* 10, 109-124 (1959)
- HUFFAKER, R.C. und L.W. PETERSON: Protein turnover in plants and possible means of its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 363-392 (1974)
- HUTNER, S.H. und L. PROVASOLI: A pigmented marine diatom requiring vitamin B₁₂ and uracil. *Phycol. News Bull.* 18, 7-8 (1953)
- IGNATIADES, L. und G.E. FOGG: Studies on the factors affecting the release of organic matter by *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve in culture. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 53, 937-956 (1973)
- ITO, O. und K. KUMAZAWA: Nitrogen assimilation in sunflower leaves and upward and downward transport of nitrogen. *Soil Sci. Plant Nutr.* 22, 181-189 (1976)
- ITO, O. und K. KUMAZAWA: Amino acid metabolism in plant leaf. II. Effect of light on the incorporation of ^{15}N -labeled ammonium and nitrate into amino acids in sunflower leaf discs. *Soil Sci. Plant Nutrit. (Japan)* 24, 299-303 (1978)
- JEFFREY, S.W.: Properties of two spectrally different components in chlorophyll c preparations. *Biochim. Biophys. Acta* 177, 456-467 (1969)

JEFFREY, S.W.: Preparation and some properties of crystalline chlorophyll c_1 and c_2 from marine algae. *Biochem. Biophys. Acta* 279, 15-33 (1972)

JEFFREY, S.W. und G.F. HUMPHREY: New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c_1 and c_2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167, 191-194 (1975)

JOHNSTON, R.: Sea water, the natural medium of phytoplankton. I. General features. *J. mar. biol. Ass. U. K.* 43, 427-456 (1963)

KAIN, J.M. und G.E. FOGG: Studies on the growth of marine phytoplankton. I. *Asterionella japonica* GRAN. *J. mar. biol. Ass. U. K.* 37, 397-413 (1958)

KANAI, R. und G.E. EDWARDS: Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. *Pl. Physiol.* 51, 1133-1137 (1973)

KANAZAWA, T., M.R. KIRK und J.A. BASSHAM: Regulatory effects of ammonia on carbon metabolism in photosynthesizing *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta* 205, 401-408 (1970)

KAREKAR, M.D. und J.V. JOSHI: Photosynthetic carbon metabolism in marine algae. *Bot. Mar.* 16, 216-220 (1973)

KENNEDY, J.R.: Release of nitrogen from amino acids with ninhydrin for ^{15}N analysis. *Anal. Biochem.* 11, 105-110 (1965)

KIRK, P.R. und R.M. LEECH: Amino acid biosynthesis by chloroplasts during photosynthesis. *Plant Physiol.* 50, 228-234 (1972)

KLEINKAUF, H.: Kohlehydrate, freie Aminosäuren und Protein-zusammensetzung einiger mariner Diatomeen und der limnischen Diatomee *Melosira varians*. *Helgol. wissenschaft. Meeresuntersuchungen*, 39-45 (1964)

KREMER, B.P. und R. BERKS: Photosynthesis and carbon metabolism in marine and freshwater diatoms. *Z. Pflanzenphysiol.* 87, 149-165 (1978)

KREMER, B.P. und U. KÖPPERS: Carboxylating enzymes and pathway of photosynthetic carbon assimilation in different marine algae-evidence for the C₄-pathway? *Planta* 133, 191-196 (1977)

KUMAZAWA, K.: Optical spectrographic analyses of heavy nitrogen (^{15}N). *Jasco Spectra* 2, 1-8 (1973)

LAWRIE, A.C., G.A. CODD und W.D.P. STEWART: The incorporation of nitrogen into products of recent photosynthesis in *Anabaena cylindrica* Lemm. *Arch. Microbiol.* 107, 15-24 (1976)

- LAWRIE, A.C. und C.T. WHEELER: Nitrogen fixation in the root nodules of *Vicia faba* L. in relation to the assimilation of carbon. *New Phytol.* 74, 437-445 (1975)
- LEA, P.J. und L. FOWDEN: Asparagine metabolism in higher plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 168, 3-14 (1975)
- LEWIN, J.C.: Physiological studies of the boron requirement of the diatom *Cylindrotheca fusiformis* REIMANN and LEWIN. *J. exp. Bot.* 17, 473-479 (1966)
- LEWIN, R.A.: Biochemical taxonomy. In: W.D.P. Stewart (ed.), *Algal physiology and biochemistry*, S. 1-39, Blackwell, Oxford, 1974
- LEWIS, O.A.M.: An ^{15}N - ^{14}C -study of the role of the leaf in the nitrogen nutrition of the seed of *Datura stramonium* L. *J. exp. Bot.* 26, 361-366 (1975)
- LEWIS, O.A.M. und M.J. BERRY: Glutamine as a major acceptor of reduced nitrogen in leaves. *Planta* 125, 77-80 (1975)
- LEWIS, O.A.M. und J.S. PATE: The Significance of transpirationally derived nitrogen in protein synthesis in fruiting plants of Pea (*Pisum sativum* L.) *J. Exp. Bot.* 24, 596-606 (1973)
- LEWIS, O.A.M. und T.A. PROBYN: ^{15}N incorporation and glutamine synthetase inhibition studies of nitrogen assimilation in leaves of the nitrophile, *Datura stramonium* L. *New Phytol.* 81, 519-526 (1978)
- LIU, M.S. und J.A. HELLEBUST: Effects of salinity and osmolarity of the medium on amino acid metabolism in *Cyclotella cryptica*. *Can. J. Bot.* 54, 938-948 (1976)
- LORD, J.M. und M.J. MERRETT: The pathway of glycollate utilization in *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochem. J.* 117, 929-937 (1970)
- LUI, N.S.T. und O.A. ROELS: Nitrogen metabolism of aquatic organisms. II. The assimilation of nitrate, nitrite and ammonium by *Biddulphia aurita*. *J. Phycol.* 8, 259-264 (1972)
- MACCALDIN, D.J.: The chemistry of ninhydrin. *Chem. Rev.* 60, 39-51 (1960)
- McKENZIE, G.H., A.L. CH'NG und K.R. GAYLER: Glutamine Synthetase/Glutamine: α -ketoglutarat aminotransferase in chloroplasts from the marine alga *Caulerpa simpliciuscula*. *Plant Physiol.* 63, 578-582 (1979)

- McKINLEY, K.R., A.K. WARD und R.G. WETZEL: A method for obtaining more precise measures of excreted organic carbon. *Limnol. Oceanogr.* 22, 570-573 (1977)
- Mc LACHLAN, J.: Some considerations of the growth of marine algae in artificial media. *Can. J. Microbiol.* 10, 769-782 (1964)
- MEEKS, J.C., C.P. WOLK, J. THOMAS, W. LOCKAU, P. SCHAFFER, S.M. AUSTIN, W. CHIEN und A. GRABOWSKY: The pathways of assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by the Cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* 252, 7894-7900 (1977)
- METZNER, P.: Papierchromatographische Trennung der Photosynthese-Intermediärprodukte, *Naturwissenschaften* 49, 183 (1962)
- MIFLIN, B.J. und P.J. LEA: The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* 15, 873-885 (1976)
- MIFLIN, B.J. und P.J. LEA: Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, 299-329 (1977)
- MIQUEL, F.: De la culture artificielle des Diatomées. *C.R. Acad. Sci. Paris* 94, 780-782 (1892 a)
- MIQUEL, F.: De la culture artificielle des Diatomées. *Le Diatomiste* 1, 92-99 (1892 b)
- MOHAMED, A.H. und A. GNANAM: A possible mechanism of ammonium ion regulation of photosynthetic carbon flow in higher plants. *Plant Physiol.* 64, 263-268 (1979)
- MUHAMMAD, S. und K. KUMAZAWA: Nitrogen distribution studies by emission spectrometry in free amino acids and amides of developing panicle of rice. *Z. Pflanzenern. Bodenk.* 5, 529-536 (1976)
- MUKERJY, D. und I. MORRIS: Photosynthetic carboxylating enzymes in *Phaeodactylum tricornutum*: assay methods and properties. *Mar. Biol.* 36, 199-206 (1976)
- MYERS, J. und W.A. KRATZ: Relation between pigment content and photosynthetic characteristics in a blue-green alga. *J. gen. Physiol.* 39, 11-22 (1955)
- NALEWAJKO, C.: Photosynthesis and Excretion in various planctonic Algae. *Limnol. Oceanogr.* 11, 1-10 (1966)
- NEUVILLE, D. und PH. DASTE: La culture des diatomées marines. *Historique critique principes fondamentaux. Année biol.* 18, 447-464 (1979 a)
- NEUVILLE, D. und PH. DASTE: L'élimination des bactéries dans les cultures de diatomées marines. *Principes généraux et applications. Année biol.* 18, 69-82 (1979 b)

- PAASCHE, E.: Effect of ammonia and nitrate on growth, photosynthesis and ribulosediphosphate carboxylase content of *Dunaliella tertiolecta*. *Physiol. Plant.* 25, 294-299 (1971)
- PARSONS, T.R.: On the pigment composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 18, 1017-1025 (1961)
- PARSONS, T.R., K. STEPHENS und J.D.H. STRICKLAND: On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 18, 1001-1015 (1961)
- PARSONS, T.R. und J.D.H. STRICKLAND: Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. Mar. Res.* 21, 155-163 (1963)
- PATIL, B.A. und G.V. JOSHI: Photosynthetic studies in *Ulva lactuca*. *Bot. Mar.* 13, 111-115 (1970)
- PAUL J.S. und B.E. VOLCANI: Photorespiration in diatoms. IV. Two pathways of Glycolate metabolism in synchronized cultures of *Cylindrotheca fusiformis*. *Arch. Microbiol.* 110, 247-252 (1976)
- PERSCHKE, H. und G. PROKSCH: Analysis of ^{15}N abundance in biological samples by means of emission spectrometry. In IAEA (ed.) Nitrogen-15 in soil-plant studies. S. 223-225 Wien 1971
- PLATT, S.G., Z. PLAUT und J.A. BASSHAM: Ammonia regulation of carbon metabolism in photosynthesizing leaf discs. *Plant Physiol.* 60, 739-742 (1977)
- PROVASOLI, L., J.J.A. McLAUGHLIN und M.R. DROOP: The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* 25, 392-428 (1957)
- PRZYBYLLA, K.-H.: Untersuchungen zum Glykolat-Metabolismus und zur CO_2 -Freisetzung bei der Blaualge *Anacystis nidulans*. Dissertation, Frankfurt a.M. 1974
- PURCZELD, P., C.J. CHON, A.R. PORTIS, H.W. HELDT und U. HEBER: The mechanism of the control of carbon fixation by the pH in the chloroplast stroma. Studies with nitrite-mediated proton transfer across the envelope. *Biochim. Biophys. Acta* 501, 488-498 (1978)
- RAMBECK, W.A. und J.A. BASSHAM: Tritium incorporation and retention in photosynthesizing algae. *Biochim. Biophys. Acta* 304, 725-735 (1973)
- RAO, K.P. und D.W. RAINS: Nitrate absorption by Barley. II. Influence of nitrate reductase activity. *Plant Physiol.* 57, 59-62 (1976)

RITTENBERG, D.: The preparation of gas samples for mass spectrometric isotope analysis. In D.W. Wilson (ed.) Preparation and measurement of isotope tracers. Ann Arbor p. 31 (1948)

ROLLE, W.: Über eine Mikromethode zur Umarbeitung von Ammonsalzen zu N_2 mit Hilfe von CuO für die Isotopenanalyse am Stickstoff. Kernenergie 5, 403-404 (1962)

RUGE, J. und N. KACZMARCZYK: Methoden der Löschkorrektur beim Flüssigkeits-Szintillations-Zähler. Kerntechnik, Isotopentechnik und -chemie 9, 399-406 (1967)

RYTHER, J.H. und W.M. DUNSTAN: Nitrogen, phosphorus and eutrophication in the coastal marine environment. Science 171, 1008-1013 (1971)

SERRA, J.L., M.J. LLAMA und E. CADENAS: Nitrate utilization by the diatom *Skeletonema costatum*. I. Kinetics of nitrate uptake. Plant Physiol. 62, 987-990 (1978 a)

SERRA, J.L., M.J. LLAMA und E. CADENAS: Characterization of the nitrate reductase activity in the diatom *Skeletonema costatum*. Pl. Sci. Lett. 13, 41-48 (1978 b)

SHARP, J.H.: Excretion of organic matter by marine phytoplankton: Do healthy cells do it?. Limnol. Oceanogr. 22, 381-399 (1977)

SLOAN, P.R. und J.D.H. STRICKLAND: Heterotrophy of four marine phytoplankters at low substrate concentrations. J. Phycol. 2, 29-32 (1966)

SMAYDA, T.J.: Bioassay of the growth potential of the surface water of lower Narragansett Bay over an annual cycle using the diatom *Thalassiosira pseudonana* (oceanic clone, 13-1). Limnol. Oceanogr. 19, 889-901 (1974)

SOLOMONSON, L.P. und A.M. SPEAR: Model for the regulation of nitrate assimilation. Nature 265, 373-375 (1977)

SPILLER, H., G. BOOKJANS und P. BÖGER: The influence of oxygen on nitrite reduction in a reconstituted system. Z. Naturforsch. 31 c, 565-568 (1976)

SUBBARAO, D.V. und T. PLATT: Optimal extraction conditions of chlorophylls from cultures of five species of marine phytoplankton. J. Fish. Res. Bd. Canada 26, 1625-1630 (1969)

SCHÄFER, H.: Beiträge zur Entsalzung mit Retardion 11 A 8. Helgol. wissensch. Meeresuntersuchungen 11, 301-322 (1964)

SCHLOEMER, R.H. und R.H. GARRETT: Nitrate transport system in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 118, 259-269 (1974)

SCHÖNE, H.K.: Die Vermehrungsrate mariner Planktondiatomeen als Parameter in der Ökosystemanalyse. Habil.-Schrift RWTH Aachen, Aachen 1977

SCHOBERT, B.: The influence of water stress on the metabolism of diatoms. I. Osmotic resistance and proline accumulation in *Cyclotella meneghiniana*. Z. Pflanzenphysiol. 74, 106-120 (1974)

SCHREIBER, E.: Die Reinkultur von marinem Phytoplankton. Wiss. Meeresuntersuch. Abt. Helgoland, N.F. 16, 1-34 (1927)

SCHROEDER, M.: Sekundärverlagerung von Stickstoff in der Pflanze. Untersuchungen mit ^{15}N bei jungen Buschbohnenpflanzen (*Phaseolus vulgaris* L.) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) in der Kornentwicklungsphase. Dissertation, Universität Stuttgart-Hohenheim, 1980

SCHÜRMANN, P.: Separation of phosphate esters and algal extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. J. Chromatogr. 39, 507-509 (1969)

STEEMANN NIELSEN, E.: The use of radio-active carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea. J. Cons. Inter. Explor. Mer 18, 117-140 (1952)

STEWART, W.D.P. und P. ROWELL: Effects of L-methionine-DL-sulphoximine on the assimilation of newly fixed NH_3 , acetylene reduction and heterocyst production in *Anabaena cylindrica*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 65, 846-856 (1975)

v. STOSCH, H.A.: Observations on *Bellerophora* and *Streptotheca*, including descriptions of three new planctonic diatom species. Nova Hedwigia 8, 113-168 (1977)

v. STOSCH, H.A.: Die zentrischen Grunddiatomeen. Beiträge zur Floristik und Ökologie einer Pflanzengesellschaft der Nordsee. Helgoländer wiss. Meeresunters. 5, 273-291 (1956)

v. STOSCH, H.A. und G. DREBES: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an zentrischen Diatomeen. IV. Die Planktondiatomee *Stephanopyxis turris*, ihre Behandlung und Entwicklungsgeschichte. Helgoländer wiss. Meeresunters. 11, 209-257 (1964)

v. STOSCH, H.A., G. THEIL und K.V. KOWALLIK: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an zentrischen Diatomeen. Bau und Lebenszyklus von *Chaetoceros didymus*. Helgol. wiss. Meeresunters. 25, 384-445 (1973)

STRAIN, H.H., B.T. COPE, G.N. McDONALD, W.A. SVEC und J.J. KATZ: Chlorophylls c_1 and c_2 . Phytochemistry 10, 1109-1114 (1971)

STRAIN, H., W. MANNING und G. HARDIN: Xanthophylls and carotenes of diatoms, brown algae, Dinoflagellates, and Sea-Anemones. Biol. Bull. 86, 169-191 (1944)

STRICKLAND, J.D.: Research on the marine planktonic food web at the institute of marine resources: a review of the past seven years of work. Oceanogr. mar. biol. Ann. Rev. 10, 349-414 (1972)

STRICKLAND, J.D., O. HOLM-HANSEN, R.W. EPPLEY und R.J. LINN: The use of a deep tank in plankton ecology. I. Studies of the growth and composition of phytoplankton crops at low nutrient levels. Limnol. Oceanogr. 14, 23-34 (1969)

THOMAS, R.J., C.R. HIPKIN und P.J. SYRETT: The interaction of nitrogen assimilation with photosynthesis in nitrogen deficient cells of *Chlorella*. Planta 133, 9-13 (1976)

TOLBERT, N.E.: Glycolate metabolism by higher plants and algae. In M. Gibbs und E. Latzko (eds.) Photosynthesis II, S. 338-352. Encycl. Plant Physiol. New Series, Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1979

TURPIN, D.H. und P.J. HARRISON: Fluctuations in free amino acid pools of *Gymnodinium simplex* (Dinophyceae) in response to ammonia perturbation: evidence for glutamine synthetase pathway. J. Phycol. 14, 461-464 (1978)

UTERMÖHL, H.: Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt. int. Verein Limnol. 9, 38 pp. (1958)

VENNESLAND, B. und M.G. GUERRERO: Reduction of nitrate and nitrite. In M. Gibbs und E. Latzko (eds.) Photosynthesis II pp. 425-444. Encycl. Plant Physiol. New Series Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1979

VICKERY, H.B., G.W. PUCHER und H.E. CLARK: Glutamine metabolism of the beet. Plant Physiol. 11, 413-420 (1936)

WALLEN, D.G. und G.H. GEEN: Light quality in relation to growth, photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae. Mar. Biol. 10, 34-43 (1971 a)

WALLEN, D.G. und G.H. GEEN: The nature of the photosynthate in natural phytoplankton populations in relation to light quality. Mar. Biol. 10, 157-168 (1971 b)

WALLEN, D.G. und G.H. GEEN: Light quality and concentration of proteins, RNA, DNA and photosynthetic pigments in two species of marine plankton algae. Marine Biology 10, 44-51 (1971 c)

- WALLSGROVE, R.M., P.J. LEA und B.J. MIFLIN: Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the Pea leaf cell. *Plant Physiol.* 63, 232-236 (1979)
- WATT, W.D.: Release of dissolved organic material from the cells of phytoplankton populations. *Proc. Royal Soc., London (B)* 164, 521-551 (1966)
- WERNER, D.: Die Kieselsäure im Stoffwechsel von *Cyclotella cryptica* REIMANN, LEWIN et GUILLARD. *Arch. Mikrobiol.* 55, 278-308 (1966)
- WERNER, D.: Introduction with a note on taxonomy. In D. Werner (ed.) *The biology of diatoms. Botanical Monographs*, Vol. 13, S. 1-17, Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburgh-Melbourne 1977 a
- WERNER, D.: Silicate metabolism. In D. Werner (ed.) *The biology of diatoms. Botanical Monographs*, Vol. 13, S. 110-149. Blackwell Scientific Publications Oxford-London-Edinburgh-Melbourne 1977 b
- WERNER, D. und E. STANGIER: Silica and temperature dependent colony size of *Bellerophila malleus* f. *biangulata* (Centrales, Diatomeae) *Phycologia* 15, 73-77 (1976)
- WETZEL, K.: Neuere Ergebnisse der Anwendung des stabilen Isotops ^{15}N in Forschung und Technik. *Isotopenpraxis* 10, 85-96 (1974)
- WILLENBRINK, J., M. RANGONI-KÜBBELER und B. TERSKY: Frond development and CO_2 -fixation in *Laminaria hyperborea*. *Planta* 125, 161-170 (1975)
- YONEYAMA, T. und K. KUMAZAWA: A kinetic study of the assimilation of ^{15}N -labeled ammonium in rice seedling roots. *Pl. Cell. Physiol. (Tokyo)* 15, 655-661 (1974)
- YONEYAMA, T. und K. KUMAZAWA: Emission spectrometric ^{15}N analysis of the amino acids and amides in plant tissues separated by thin layer chromatography. *Analyt. Biochem.* 67, 327-331 (1975 a)
- YONEYAMA, T. und K. KUMAZAWA: A kinetic study of the assimilation of ^{15}N -labelled nitrate in rice seedlings. *Plant Cell Physiol., Tokyo*, 16, 21-26 (1975 b)
- ZELITCH, J.: Plant productivity and the control of photo-respiration. *Proc. Nat. Acad. USA* 70, 579-584 (1973)

7. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Ala	=	Alanin
As	=	Aminosäuren
Asp	=	Aspartat
Asp-NH ₂	=	Asparagin
FbP	=	Fructose-1,6-bisphosphat
F-6-P	=	Fructose-6-phosphat
Gler	=	Glycerat
Glo1	=	Glykolat
Glu	=	Glutamat
Glu-NH ₂	=	Glutamin
Gly	=	Glycin
G-1-P	=	Glucose-1-phosphat
G-6-P	=	Glucose-6-phosphat
GDH	=	Glutamat-Dehydrogenase
GS	=	Glutamin-Synthetase
GOGAT	=	Glutamin: α -Ketoglutarat-Aminotransferase
Ileu	=	Isoleucin
PEP	=	Phosphoenolpyruvat
PGlo1	=	Phosphoglykolat
PGS	=	Phosphoglycerinsäure
RubP	=	Ribulose-1,5-bisphosphat
SbP	=	Sedoheptulose-1,7-bisphosphat
Ser	=	Serin
Threo	=	Threonin
Val	=	Valin
ZbP	=	Zuckerbisphosphate
ZmP	=	Zuckermonophosphate

L E B E N S L A U F

Name:	Hans-Jürgen Roßlenbroich
23.01.1953	geboren in Krefeld-Uerdingen
Familienstand:	verheiratet, ein Kind
Ostern 1959 bis Ostern 1963	Besuch der Katholischen Volksschule am Kaiserplatz in Krefeld
ab Ostern 1963	Besuch des Gymnasiums am Moltkeplatz in Krefeld
18.05.1971	Reifeprüfung
WS 1971/72 bis WS 1972/73	Studium der Biologie und Chemie mit dem Ziel des Staatsexamens an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main
ab WS 1972/73	Studium der Biologie mit dem Ziel des Diploms
28.03.1974	Ablegung der Diplom-Vorprüfung für Biologen in den Fächern Allgemeine Zoologie, Allgemeine Botanik, Physik und Chemie; Gesamtnote "sehr gut"
01.10.1974 bis 31.03.1977	wissenschaftliche Hilfskraft ohne Abschluß; Mitarbeit in morpholo- gisch-anatomischen Praktika sowie Betreuung von Versuchen in pflanzen- physiologischen Kursen
12.03.1976	Ablegung der Diplom-Hauptprüfung für Biologen in den Fächern Botanik (Hauptfach), Biochemie und Mikro- biologie; Gesamtnote "sehr gut"
05.04.1976 bis 06.05.1976	Forschungsaufenthalt an Bord des Fischereiforschungsschiffes "Anton Dohrn" im Rahmen von Flex '76" (Fladen Ground Experiment), einem internationalen Forschungsprogramm zur Untersuchung der physikalisch- chemisch-biologischen Parameter der Frühjahrsplanktonblüte in der Nordsee

15.03.1977

Diplom-Biologe

Thema der Diplomarbeit: "Einfluß
der Lichtintensität auf die photo-
synthetische CO₂-Fixierung des
marinen Phytoplanktons"

Betreuer der Diplomarbeit:
Prof. Dr. G. Döhler

01.04.77 bis 31.07.78
und
01.04.79 bis 31.07.79

wissenschaftliche Hilfskraft mit
Abschluß; Betreuung von Versuchen
in pflanzenphysiologischen Kursen

01.08.1978 bis
31.01.1979

wissenschaftlicher Mitarbeiter in
dem von der Deutschen Forschungs-
gemeinschaft geförderten Programm
"Stickstoff-Assimilation"

seit 01.08.1979

Stipendiat nach dem Graduierten-
förderungsgesetz

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
Bock, Brendel, Butterfaß, Döhler, Doiwa, Egle, Fasold,
Fiedler, Hanke, Hartmann, Hilgenberg, Hohorst, Jahns, Kahl,
Kaplan, König, Kohlenbach, Kranz, Lange-Bertalot, Leistikow,
Lindauer, Lötschert, Lotz, Ludwig, Martienssen, Martin,
Mennigmann, Merkel, Müser, Pons, Quinkert, Rhaese, A. Ried,
W. Ried, Rosenmund, Rosenstock, Schaub, Stauff, Steiger,
Wild, Winter, Ziegler

